

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO
PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

STANOVENÍ VYBRANÝCH PESTICIDŮ POMOCÍ PLYNOVÉ
CHROMATOGRAFIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. MONIKA BUKÁČKOVÁ

BRNO 2012



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

STANOVENÍ VYBRANÝCH PESTICIDŮ POMOCÍ PLYNOVÉ CHROMATOGRAFIE

ASSESSMENT OF SELECTED PESTICIDES USING GAS CHROMATOGRAPHY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. MONIKA BUKÁČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. MILADA VÁVROVÁ, CSc.

BRNO 2012



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0651/2011	Akademický rok: 2011/2012
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	Bc. Monika Bukáčková	
Studijní program:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)	
Studijní obor:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)	
Vedoucí práce	prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.	
Konzultanti:	Ing. Ludmila Mravcová, Ph.D.	

Název diplomové práce:

Stanovení vybraných pesticidů pomocí plynové chromatografie

Zadání diplomové práce:

1. Zpracování literární rešerše na dané téma
2. Výběr skupiny pesticidů pro vlastní stanovení
3. Optimalizace metody pro stanovení pesticidů
4. Aplikace metody při stanovení reálných vzorků vod
5. Zpracování výsledků a jejich interpretace

Termín odevzdání diplomové práce: 25.5.2012

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Monika Bukáčková
Student(ka)

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Předložená diplomová práce se zabývá stanovením vybraných pesticidů ve vzorcích vody pomocí plynové chromatografie. Stanovované pesticidy jsou ze skupiny organofosfátů (chlorpyrifos, diazinon, parathion, dimethoate, phosmet) a karbamátů (carbofuran, aldicarb, methiocarb, pirimicarb a propamocarb).

V teoretické části je uvedeno rozdělení pesticidů a jsou zde popsány jejich vlastnosti, osud v životním prostředí a nežádoucí účinky. Dále jsou zde charakterizovány možnosti analytického stanovení, zaměřené na plynovou chromatografii. Experimentální část se zabývá zpracováním vzorků a jejich následnou analýzou. Jako extrakční technika byla zvolena extrakce tuhou fází. Byly optimalizovány dva druhy kolonek (Oasis HLB a Supelclean ENVI-18) v kombinaci s různými elučními činidly. Nejvhodnější kombinace byla poté použita pro zpracování reálných vzorků odpadní vody, které byly odebírány na ČOV v Brně Modřicích. Při vlastním stanovení analytů plynovou chromatografií byly použity dva typy detektorů: hmotnostní spektrometr a detektor elektronového zachytu.

ABSTRACT

The submitted thesis deals with determination of selected pesticides in water samples by gas chromatography. The target pesticides belong to the group of organophosphates (chlorpyrifos, diazinon, parathion, dimethoate, phosmet) and carbamates (carbofuran, aldicarb, methiocarb, pirimicarb, and propamocarb).

In the theoretical part, the division of pesticides is stated, and their properties are described, as well as their fate in the environment and their negative effects. Then, the possibilities of analytical determination based on gas chromatography are characterized. The experimental part describes the treatment of the samples and their subsequent analysis. Solid phase extraction was chosen as the extraction technique. Two kinds of cartridges were optimized (Oasis HLB and Supelclean ENVI-18) in combination with various elution reagents. The most suitable combination was then used for processing of real samples of waste-water, which was taken from WWTP in Brno Modřice. For the final determination of the target compounds by gas chromatography, two types of detectors were used: mass spectrometer and an electron capture detector.

KLÍČOVÁ SLOVA

organofosfáty, karbamáty, odpadní voda, extrakce tuhou fází, plynová chromatografie GC/MS, GC/ECD

KEYWORDS

organophosphates, carbamates, waste water, solid phase extraction, gas chromatography GC/MS, GC/ECD

BUKÁČKOVÁ, M. *Stanovení vybraných pesticidů pomocí plynové chromatografie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 82 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis

Poděkování: Chtěla bych poděkovat vedoucí diplomové práce paní prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. za odborné vedení, trpělivost při vzájemné spolupráci a pomoc při tvorbě této práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Petru Lacinovi za jeho pomoc v laboratoři, odborné rady a vstřícnost.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1 Pesticidy	8
2.1.1 Klasifikace pesticidů	8
2.1.2 Historie	10
2.1.3 Obecné vlastnosti	12
2.1.4 Osud pesticidů v životním prostředí.....	12
2.1.5 Nežádoucí účinky.....	13
2.1.6 Bezpečné používání.....	14
2.1.7 Legislativa	15
2.2 Insekticidy	15
2.3 Herbicidy.....	16
2.4 Fungicidy.....	19
2.5 Vybrané pesticidy.....	19
2.6 Stanovení vybraných pesticidů.....	24
2.6.1 Extrakční techniky.....	24
2.6.1.1 Extrakce tuhou fází (SPE)	28
2.6.2 Plynová chromatografie	30
2.6.2.1 Detektor elektronového záchytu.....	32
2.6.2.2 Hmotnostně spektrometrický detektor	33
2.6.2.3 GC× GC-TOF-MS.....	34
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
3.1 Přístroje, pracovní pomůcky, chemikálie, standardy	37
3.1.1 Přístroje a zařízení.....	37
3.1.2 Pracovní pomůcky.....	37
3.1.3 Chemikálie	37
3.1.4 Standardy.....	37
3.1.4.1 Příprava kalibračních roztoků	37
3.2 Optimalizace SPE pro extrakci vybraných pesticidů	38
3.2.1. Postup SPE.....	38
3.3 Odběr, zpracování a analýza vzorků	38
3.3.1 Úprava vzorků, extrakce	39
3.3.1.1 Postup SPE	39
3.3.2 Analýza vzorků	39
3.3.2.1 Nastavení GC/MS-TOF.....	39
3.3.2.2 Nastavení GC/ECD	40
3.3.3 Ukázka analýzy vzorků pomocí dvoudimenzionální chromatografie.....	40
3.3.3.1 Nastavení GC × GC-TOF-MS.....	41
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	42
4.1 Optimalizace podmínek analýzy	42
4.1.1 Nastavení GC/MS	42
4.1.1 Optimalizace podmínek analýzy na přístroji Pegasus IV D.....	44

4.2 Optimalizace SPE pro extrakci vybraných pesticidů	46
4.2.1 Ověření výtěžnosti vybrané SPE metody pro reálné vzorky.....	48
4.3 Kalibrace, limity detekce a kvantifikace	50
4.4 Výsledky stanovení pesticidů ve vzorcích odpadní vody	53
4.5 Výsledky stanovení pesticidů ve vzorcích povrchové vody	63
4.6 Analýza vybraných vzorků pomocí dvoudimenzionální chromatografie	65
5. ZÁVĚR.....	70
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	71
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	77
8. PŘÍLOHY.....	79
8.1 Strukturní vzorce sledovaných pesticidů.....	79
8.2 Celkový pohled na čistírnu odpadních vod v Brně Modřicích.....	81
8.2.1 Kalové hospodářství	81
8.2.2 Aktivační nádrž (biologický stupeň čištění).....	82
8.3 Ukázka extrakce tuhou fází	82

1. ÚVOD

Třicátá léta 20. století jsou považována za počátek moderní éry syntetických pesticidů. Od této doby bylo připraveno tisíce pesticidních přípravků, které jsou schopné ničit, popř. regulovat „škodlivé“ organismy. Jak je známo, využívají se především v zemědělství. Také se aplikovaly a dosud ještě aplikují (hlavně v regionech Afriky a Latinské Ameriky) jako prostředky na hubení hmyzu přenášejícího infekční choroby – především malárii. Použití těchto látek (tzv. insekticidů), a to i přes významné mezinárodní aktivity, jako je Stockholmská úmluva¹, stále neklesá [1, 2, 19].

V České republice je v současné době používáno více než 400 schválených látek a organismů s pesticidními účinky. Avšak, a to kromě zajištění spolehlivého přísunu zdravých zemědělských produktů vysoké kvality, mohou tyto látky současně vyvolávat i nechtěné nežádoucí účinky u necílových organismů a tak ohrožovat lidské zdraví a životní prostředí. O škodlivosti pesticidů již bylo napsáno mnoho. Negativní následky jejich působení vedly k regulaci jejich dalšího používání a v roce 2006 zveřejnila Evropská komise návrh směrnice a strategii k dosažení udržitelného používání pesticidů, který byl roku 2009 schválen. Usilovalo se především o snížení závislosti zemědělců na těchto látkách. I přes veškeré snahy zabránit jejich nežádoucím účinkům a omezit rizika spojená s používáním pesticidů lze v určitých environmentálních složkách stále ještě nalézt nežádoucí množství pesticidů. V současnosti je v EU považováno za alarmující zejména znečišťování vody. Mnohé řeky tekoucí v nížinách obsahují množství pesticidů několikanásobně přesahující limitní hodnotu 0,1 mg·l⁻¹ [1, 3].

Na ochranu spotřebitelů před škodlivými účinky pesticidů byly již před několika lety zavedeny speciální přísné normy, které nám určují, jaké procento pesticidů může být v potravinách. V evropské unii se jeho kontrolou zabývá speciální komise DG-SANCO². Přestože je úroveň hladin pesticidů v potravinách stále kontrolována, znamená dlouhodobá konzumace takto pěstovaných potravin zvýšené riziko. Možné následky jejich působení jsou stále v centru pozornosti vědeckých výzkumů [1, 3, 4].

Je proto nutné co možná nejvíce omezovat rizika vlivu pesticidů pro člověka a životní prostředí a to tak, že se bude minimalizovat, případně podle možnosti eliminovat expozice těmito přípravky. Zároveň je nezbytné podněcovat výzkum a vývoj jejich méně škodlivých alternativ, včetně těch, které nejsou založeny na chemických látkách [3, 4].

Tato práce je zaměřena na stanovení vybraných pesticidů ze skupiny organofosfátů a karbamátů pomocí plynové chromatografie. I když se nejedná o chlorované ani vysoce perzistentní látky, je jejich sledování v životním prostředí neméně důležité. Při dodržování správné zemědělské praxe by nemělo docházet k výraznému zatěžování životního prostředí přípravky používanými pro ochranu plodin. Pokud jsou vybrané pesticidy aplikované podle těchto zásad, nepůsobují v životním prostředí žádnou škodu. Často však dochází k jejich porušování, což vede ke vzniku kontaminace nebo k negativním dopadům na necílové organismy. Monitoring jednotlivých složek životního prostředí je proto velmi důležitý pro zodpovědné zacházení s chemickými látkami.

¹Stockholmská úmluva o perzistentních organických polutantech je mezinárodní dohoda, jejímž cílem je ochrana lidského zdraví a životního prostředí před škodlivými vlivy perzistentních organických polutantů (POPs). V České republice vstoupila v platnost v roce 2004 [5].

² DG-SANCO (Generální ředitelství pro zdraví a ochranu spotřebitele). Jeho posláním je uplatňovat efektivní kontrolní systém potravinové bezpečnosti v členských státech EU, kontrolovat shodu legislativy v oblasti potravinové bezpečnosti v rámci EU a dohlížet na implementaci veterinární, rostlinolékařské a potravinářské legislativy [6].

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Pesticidy

Pesticidy jsou látky nebo směsi látek chemického nebo biologického charakteru používané proti rostlinným a živočišným škůdcům. Mají schopnost ovlivňovat základní procesy v živých organismech, a proto mohou ničit nebo regulovat škodlivé činitele. Aplikují se především v zemědělství, kde slouží na ochranu užitkových rostlin proti plevelům, proti působení hmyzu nebo houbovým chorobám. V menší míře se používají i k ochraně různých materiálů, potravin, dále k regulaci růstu rostlin mimo zemědělskou půdu nebo také proti živočichům škodlivým pro člověka a domácí zvířata. Vyráběných pesticidních přípravků jsou tisíce a mají velmi rozdílnou chemickou strukturu. Lze je aplikovat několika způsoby (poprašky, postřiky, granuláty, suspenze, emulze, aerosoly, pěny, pasty atd.), které se odvíjejí od jejich fyzikálních vlastností. Výhodnou a relativně bezpečnou formou použití pesticidů dodávaných do půdy jsou granuláty, které se rozpustí za určitých podmínek, tj. pH vody a vlhkosti.

I když jsou pesticidy jednou z cest k zajištění výživy lidstva, mají často i nepříznivý vliv na životní prostředí a ohrožují lidské zdraví. Vedle cíleného použití se mohou dostat do jiných ekosystémů, kde představují riziko pro necílové rostliny, volně žijící živočichy a ovlivňují kvalitu povrchových i podzemních vod. Z toho plynou také vysoké vodárenské náklady na úpravu vody a také náklady na monitorování obsahu pesticidů v povrchových a podzemních vodách. Lidské zdraví mohou ovlivňovat přímo (při výrobě) nebo nepřímo, kdy je spotřebitelé konzumují v potravinách a ve vodě; do kontaktu s nimi přicházejí obyvatelé v okolí míst aplikace apod. U lidí, kteří jsou pesticidům vystaveni při jejich výrobě a aplikaci, může dojít nejen k celé řadě otrav, ale také ke kožnímu, nervovému nebo dýchacímu onemocnění. Pro člověka však největší nebezpečí představuje chronické působení pesticidů, které se může projevit např. rozmanitými typy rakoviny, vrozenými vývojovými vadami, narušením mužské i ženské plodnosti, alergiemi, narušením imunity atd. Zdravotní a ekologická rizika pesticidů jsou posuzována během jejich povolování. Bohužel se prozatím nedaří uspokojivě posoudit zejména účinky směsi chemikálií (tzv. koktejlový efekt), a proto není zatím možné vyhodnotit celkový vliv všech používaných látek na lidské zdraví a na životní prostředí [1, 7, 8].

K omezení negativních vlivů se stanovují nejen ochranné lhůty v období mezi aplikací pesticidů a sklizní, a také nejvyšší přípustná množství reziduí v zemědělských produktech [7].

2.1.1 Klasifikace pesticidů

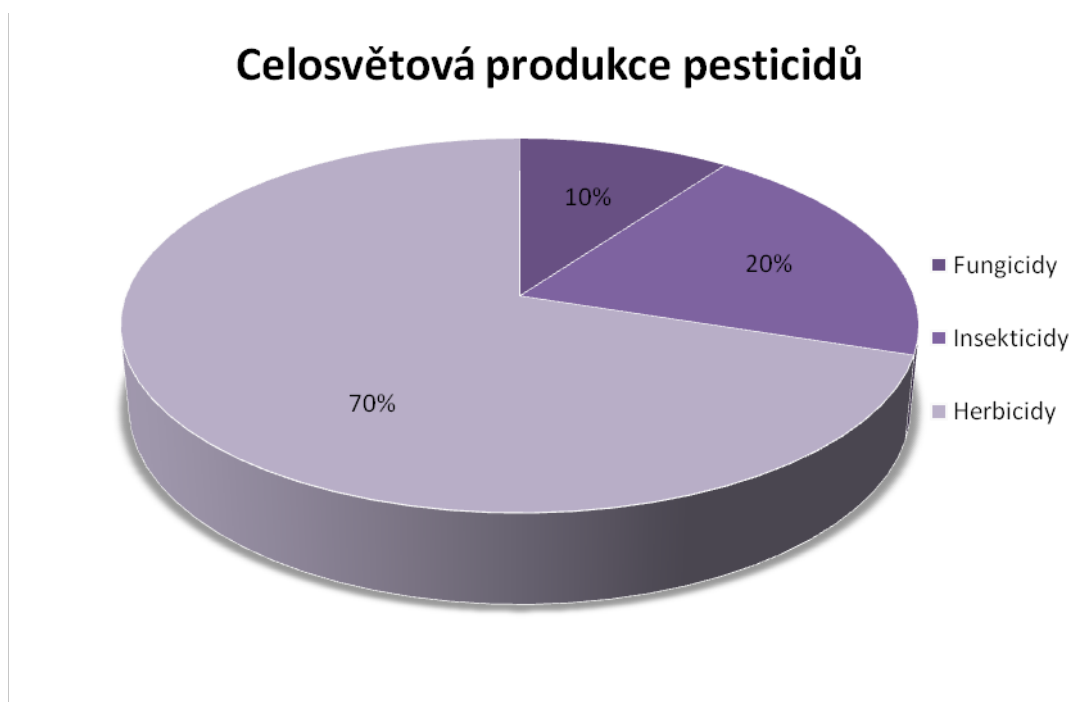
Pesticidy lze rozdělit na skupiny podle několika různých faktorů. Nejčastěji se setkáváme s dělením podle biologického účinku dané látky. Kromě toho je možné pesticidní přípravky klasifikovat také podle stability, způsobu působení nebo rozsahu účinku.

Podle biologické účinnosti:

- herbicidy (prostředky proti plevelům)
- fungicidy (prostředky proti houbám a plísním)
- zoocidy (prostředky proti živočišným škůdcům)
 - insekticidy (prostředky k hubení hmyzu)

- akaricidy (prostředky k hubení roztočů)
- nematocidy (prostředky k hubení půdních škůdců)
- rodenticidy (prostředky k hubení hlodavců)
- avicidy (prostředky k hubení škodlivých ptáků)
- moluskocidy (prostředky k hubení měkkýšů) [7].

Z výše uvedených skupin mají největší význam herbicidy, které tvoří asi 70 % celkové světové produkce [9].



Graf č. 1: Celosvětová produkce pesticidů

Podle stability:

- lehce odbouratelné sloučeniny
- trvanlivé (perzistentní) sloučeniny, které mohou být ve své původní nebo změněné formě prokazatelné v ekosystému po dlouho dobu [10].

Podle způsobu působení:

- kontaktně (dotykově) působící, které působí pouze v místě ošetření
- systémově působící, které mají schopnost penetrovat kutikulou listů nebo mohou být přijímány kořenovým systémem a odtud transportovány do celé rostliny [9].

Podle rozsahu účinku:

- totální
- širokospektré
- selektivní [10].

2.1.2 Historie

Již od počátku civilizace se lidé neustále snažili zlepšovat své životní podmínky, ke kterým patří i dostatečné zajištění potravy. Hospodářské plodiny byly často napadány škůdci a chorobami, které způsobovaly velké ztráty výnosu a hladomory, což značně přispělo k vývoji a aplikaci pesticidů.

Jedním z prvních pesticidních přípravků byla síra používaná již před rokem 1000 př. n. l., a to k potírání chorob kulturních rostlin. Zhruba od poloviny 19. století se začalo se zemědělskými škůdci bojovat chemickými metodami. Sice již ve starověku a středověku byly známy některé chemické prostředky proti škůdcům a chorobám, avšak zemědělci je používali, aniž by znali bližší vztahy mezi škodlivým činitelem a použitým prostředkem. Až v 19. století se poprvé setkáváme se systematickým používáním přípravků na ochranu rostlin. Víceméně až do počátku 20. století se k hubení škodlivých činitelů využívaly anorganické látky, jakými jsou např. chlorečnan sodný, síran amonný, arzeničnan sodný, arzeničnan měďnatý, arzeničnan olovnatý, síran měďnatý nebo organické chemikálie získané z přírodních zdrojů (rotenon, pyrethrum). Aplikace, a to zejména arzenových pesticidů, vedla ke vzniku nebezpečných reziduí v ošetřených plodinách, a proto se hledaly méně nebezpečné prostředky. Třicátá léta 20. století jsou počátkem moderní éry výroby syntetických pesticidů. Roku 1939 Paul H. Müller objevil silné insekticidní vlastnosti DDT [11, 12].

Tabulka č. 1: Přehled historického vývoje pesticidů [11]

rok	vývoj pesticidů	poznámka
8000 př. n. l.	počátky zemědělství	
2500 př. n. l.	Starověk – použití síry proti hmyzu a roztočům.	
900 n. l.	Čína – použití arzenu proti hmyzu.	
1300 n. l.	Marco Polo píše o používání minerálních olejů proti svrabu u velbloudů.	
několik století	Jižní Amerika – domorodci používali rostlinu Sabadillu jako přípravek proti vším.	
18. století	Ropa, petrolej a terpentýn se používají jako insekticidy.	
1809	Francie – objevení nikotinu jako prostředku proti mšicím.	
1826	Michael Faraday – objev BHC.	Insekticidní vlastnosti objeveny roku 1940 ve Francii a Anglii.
1848	Rotenon byl použit jako insekticid.	
1867	Neznámy vynálezce zjistil účinky pařížské zeleně proti hmyzu.	
1873	Poprvé laboratorně připraveno DDT.	Jeho insekticidní účinky objevil Paul H. Müller roku 1939.
1882	Bordeauxská jícha se používá jako prostředek k ochraně rostlin.	
1892	Arzeničnan olovnatý – použití proti bekyni.	1907/1911 – průmyslová výroba arzeničnanu olovnatého.
1913/1915	USA – použití organických sloučenin rtuti k ošetření semen.	Od roku 1920 se široce využívají sloučeniny rtuti jako fungicidů.
1921	První letecká aplikace insekticidů.	
1932	Methylbromid poprvé použit jako fumigant.	
1946	Používání organofosfátů jako insekticidů.	
1965	Atrazin registrován jako herbicid.	
1974	Glyfosfát registrován jako herbicid.	První moderní systémový neselektivní herbicid s rychlou inaktivací v půdě.
1979	První syntetický pyrethroid registrován jako insekticid.	
1985	Registrace herbicidů na bázi močoviny, včetně sulfonylmočoviny.	Vysoká účinnost již při malých dávkách.
1997	Fipronil registrován jako systémový insekticid.	

2.1.3 Obecné vlastnosti

K pesticidům se řadí velké množství látek, které mají velmi rozdílnou chemickou strukturu. Budou proto vykazovat i různé fyzikálně-chemické vlastnosti. K predikci chování reziduí pesticidů v různých biologických systémech se využívají následující parametry:

- Rozpustnost ve vodě. Sloučeniny dobře rozpustné ve vodě jsou snáze biodegradovatelné (např. oxidační reakce, hydrolýza). Na druhou stranu mohou snadno přecházet do vodních toků nebo do zdrojů pitné vody, ze kterých se, a to vzhledem k nižší těkavosti, jen obtížně uvolňují do atmosféry. Nejméně rozpustné jsou organochlorové látky (např. u DDT je v literatuře uváděna hodnota rozpustnosti od $1,2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ až po $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). Naproti tomu organofosforové pesticidy jsou značně rozpustné, hodnota jejich rozpustnosti dosahuje až $1000 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.
- Rozdělovací koeficient oktanol-voda (K_{ow}), který vyjadřuje afinitu rezidua k tukům. Látky s vysokou hodnotou K_{ow} (např. organochlorové pesticidy) se snadno kumulují v tukové složce živých organismů. Za látky snadno rozpustné v tucích se považují sloučeniny s hodnotami pK_{ow} ($-\log K_{ow}$) vyššími než 4.
- Tlak nasycených par, který se používá při hodnocení způsobu atmosférického transportu reziduí. Předpokládá se, že látky s hodnotami tlaku nasycených par nižšími než $1\cdot 10^{-7}$ mPa, jsou asociovány s pevnými částicemi; v opačném případě se nacházejí ve formě par.
- Půdní adsorpční koeficient K_{OC} vyjadřuje schopnost pesticidů vázat se na půdní částice. Charakterizuje míru perzistence reziduí v půdním prostředí. Látky s vyššími hodnotami K_{OC} se váží silněji a v důsledku toho jsou obtížněji biodegradovatelné. Také se velmi málo vypařují a uvolňují do vodního prostředí.
- Biokoncentrační faktor BCF vyjadřuje míru přechodu reziduí pesticidu z vodního prostředí a rovněž biokoncentraci v určitém organismu. Stanovuje se jako poměr rovnovážných koncentrací reziduí v organismu a ve vodě [9, 13, 14].

2.1.4 Osud pesticidů v životním prostředí

I když se pesticidní přípravky aplikují podle zásad GAP, nelze vyloučit kontaminaci jednotlivých složek životního prostředí. Například při ošetření ovocných stromů postřikem se odhaduje, že asi 65 % zasáhne listovou plochu, 25 % půdu a 10 % se uvolní do atmosféry. V jednotlivých složkách životního prostředí potom dochází k degradaci vlivem fyzikálních, chemických a biologických vlivů. Tyto přeměny závisí na prostředí, ve kterém probíhají.

Ve vodním prostředí probíhá zejména hydrolýza. Při extrémních hodnotách pH se reakce uskutečňuje velmi rychle. Mezi pesticidy, které snadno podléhají hydrolýze, patří např. organofosfáty. K hydrolýze může docházet rovněž i v půdě.

Další významná reakce vedoucí k eliminaci pesticidů je fotolýza, která je iniciována slunečním zářením. Vlivem tepla dochází k termickému rozkladu např. karbamátů (přímá fotolýza). Jako nepřímá fotolýza je označován proces, který je iniciován působením volných radikálů, vznikajících v prostředí účinkem slunečního záření. Ta se uplatňuje především při degradaci triazinů, kdy dochází vlivem UV záření k odštěpení alkylových řetězců.

Oxidačně-redukční reakce se také významně podílejí na degradaci pesticidů. Probíhají ve vodním prostředí při pH=1-4. Těmto reakcím podléhají zejména triaziny (dochází k eliminaci atomu chloru z molekuly), organochlorové pesticidy nebo organofosfáty. Bylo prokázáno, že

oxidací malathionu ve vodě vzniká malaaxon, podobně parathion-methyl je oxidován na paraoxon-methyl atd.

Na odbourání látek kontaminujících životní prostředí se výrazně podílejí i mikroorganismy. Pesticidy mohou vstupovat do běžných metabolických dějů probíhajících v mikrobiální buňce, případně mohou být pro daný mikroorganismus zdrojem uhlíku a dusíku. Biologická rozložitelnost pesticidů závisí na jejich struktuře. Biologicky těžce rozložitelné jsou zejména organochlorové pesticidy, snadněji se rozkládají např. organofosfáty, karbamáty nebo deriváty kyseliny fenoxycetové. Za degradaci pesticidů jsou odpovědné především bakterie. Bylo prokázáno, že například bakterie rodu *Pseudomonas*, *Flavobacterium* nebo *Serratia* způsobují degradaci chlorovaných organických látek (např. DDT) přítomných ve vodě a půdě. Aldicarb je účinně odbouráván působením bakterií rodu *Methylosinus*. Pro účinnou degradaci je nutné, aby mikroorganismy měly optimální podmínky pro svoji činnost, zejména vhodnou teplotu a pH [14, 15, 17].

2.1.5 Nežádoucí účinky

Škodlivý účinek pesticidů na živý organismus spočívá především v toxicitě aktivní látky (popř. několika aktivních látek) obsažené v daném přípravku. Pesticidy mohou způsobit akutní nebo chronickou toxicitu. Akutní toxicita pro člověka a teplokrevné živočichy je vyjádřena tzv. letální dávkou (LD_{50}), která udává množství pesticidu (v miligramech na kilogram hmotnosti pokusného zvířete), při jehož jednorázovém požití zahyne 50 % pokusných zvířat. WHO (World Health Organization) doporučuje rozdělení pesticidů do pěti tříd na základě jejich letální dávky:

- extrémně nebezpečné ($LD_{50} < 5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)
- vysoce nebezpečné (LD_{50} od 5 do $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)
- mírně nebezpečné (LD_{50} od 50 do $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)
- slabě nebezpečné ($LD_{50} > 500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)
- látky, které při normálním použití nepředstavují žádné riziko ($LD_{50} > 2000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) [7, 17].

Chronická toxicita vyjadřuje přijatelnou denní dávku pro člověka v mg (ADI).

Aby došlo k intoxikaci, musí jedovatá látka proniknout do těla člověka. Doba, po kterou je organismus vystaven škodlivým účinkům jedu, se nazývá expozice. Pesticidy pronikají do organismu člověka nejčastěji přes trávicí soustavu, pokožku nebo dýchací cesty. Nejvíce nebezpečný je vstup přes dýchací cesty, kdy jsou látky rychle vstřebávány a dochází k okamžité otravě.

Při posuzování toxicity se musí postupovat individuálně, a to s přihlédnutím ke všem vlastnostem daného pesticidního přípravku. Některé látky sice vykazují relativně malou toxicitu, však v lidském organismu se mohou kumulovat a ve větších koncentracích se potom stávají velmi nebezpečnými. Jiné se zase nesnadno metabolizují a jsou proto daleko nebezpečnější než látky se stejnou toxicitou, které se rychle rozkládají na neškodné produkty. Nebezpečné jsou i zdánlivě nejedovaté látky, jejichž rozkladem vznikají značně toxické degradační produkty.

Před zavedením do praxe se musí všechny pesticidy podrobit toxikologickému výzkumu, který vyhodnotí riziko pro životní prostředí a vliv toxikantu na zdraví člověka. První část

výzkumu spočívá v první řadě v identifikaci sloučeniny, poznání její struktury, chemického složení a z toho vyplývajících fyzikálně-chemických vlastností. Tyto vlastnosti mají vliv na osud pesticidů v životním prostředí. Hodnotí se např. molekulová hmotnost, teplota varu, rozpustnost ve vodě a v tucích, sorpční koeficient v půdě, stálost a reakce v prostředí. Druhou část výzkumu tvoří pokusy na zvířatech. Pomocí nich se určuje akutní a chronická toxicita, rakovinotvorné, mutagenní a teratogenní účinky, vliv na plodnost a vliv na nervovou soustavu [7, 14, 16, 17].

2.1.6 Bezpečné používání

Právní předpisy zajišťují správné používání pesticidů, aby nedocházelo k poškození zdraví člověka a životního prostředí. Pesticidy, které jsou schválené (registrované), jsou podrobovány kontrole a příslušné schválení může být kdykoliv odebráno. O bezpečném užívání těchto přípravků nás informují údaje uvedené na štítku obalu. Jsou zde uvedeny instrukce pro bezpečnou a účinnou aplikaci a rady pro ochranu osob, domácích zvířat a životního prostředí. Rovněž je zde napsáno registrační číslo, kterým jsou označeny pouze pesticidy schválené podle příslušných předpisů. V případě nehody je důležité znát toto číslo a názvy účinných přísad. Dále na štítku bývají uvedeny i následující informace:

- k jakým účelům je výrobek schválen (pesticid nesmí být použit k jinému účelu)
- kdo může pesticid používat; tj. zda je schválen pro:
 - běžného uživatele - je k dispozici široké veřejnosti
 - profesionálního uživatele - může být aplikován pouze osobami, které musí používat pesticidy v rámci své činnosti a absolvovali školení o bezpečnosti a ochraně zdraví při práci
 - průmyslového uživatele - může být používán pouze v provozech pro předběžnou úpravu dřeva, a to k ochraně před houbami nebo napadením hmyzem. Může být aplikován pouze uživateli oprávněnými pesticidy používat, kteří jsou proškoleni v oblasti bezpečnosti a ochrany zdraví při práci.
- zda je zapotřebí při práci s pesticidy používat osobní ochranné pracovní prostředky
- zda musí být omezen přístup do prostor, kde se pracuje s pesticidy
- jak používat pesticidy, abychom zabránili poškození životního prostředí a fauny, např. úhynu ryb a včel [18, 19].

K preventivním opatřením, která mají zabránit otravám pesticidy, patří také dodržování ochranných lhůt pro různé plodiny. Za ochrannou lhůtu je považována doba mezi posledním ošetřením kulturní rostliny pesticidním přípravkem a její sklizní, během které nastává rozklad této látky. Pro jednotlivé pesticidy je ochranná lhůta různě dlouhá a závisí především na stabilitě dané látky a na druhu kulturní rostliny.

Velkou chemickou a biochemickou stálost prokazují chlorované pesticidy, které setrvávají v prostředí velmi dlouhou dobu. Proto se jejich používání v zemědělské praxi omezuje nebo již bylo zastaveno, avšak ve složkách životního prostředí jsou stále ještě prokazatelné [13, 15].

2.1.7 Legislativa

Používání pesticidů se řídí přísnými předpisy a správnou zemědělskou praxí (GAP). Přesto nelze vyloučit, že ve sklizených plodinách nezůstanou jejich nepatrné obsahy, tzv. rezidua. Za rezidua se označují zbytková množství nejen samotných účinných látek, ale také jejich metabolitů nebo rozkladných produktů. Pravidla pro rezidua pesticidů upravuje nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) C. 396/2005 ze dne 23. února 2005 o maximálních limitech reziduí pesticidů v potravinách a krmivech rostlinného a živočišného původu a na jejich povrchu. Maximálním limitem reziduí (MLR) pesticidů se rozumí nejvyšší úroveň obsahu těchto látek, které jsou ještě v plodině, potravine nebo krmivu ze zdravotního hlediska přípustné [19].

Registraci pesticidních přípravků, které se mohou používat na ochranu rostlin, provádí v ČR Státní rostlinolékařská správa. Ta vede úřední registr přípravků, a také sleduje účinnost pesticidů na ochranu rostlin, včetně jejich vedlejších účinků [14].

Další legislativní zákony a předpisy týkající se pesticidů jsou:

- Zákon č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví, ve znění pozdějších předpisů.
- Zákon o chemických látkách a přípravcích, kterým se stanoví práva a povinnosti při výrobě, klasifikaci, zkoušení nebezpečných vlastností, balení a označování, uvádění na trh, používání a dovozu a vývozu chemických látek č. 356/2003 Sb. ve znění Zákona 345/2005 Sb. a 371/2008 Sb.
- Zákon o rostlinolékařské péči 326/2004 Sb. s prováděcí vyhláškou 329/2004 Sb. o přípravcích a dalších prostředcích na ochranu rostlin.
- Seznamy látek, jejichž uvádění na trh je omezeno – vyhláška č. 221/2004 Sb., ve znění pozdějších předpisů.
- Rizikové prvky v půdách, které náleží do zemědělského půdního fondu; Vyhláška č. 13/1994 Sb. [20-24].

2.2 Insekticidy

Představují pesticidní přípravky, které jsou určeny k hubení hmyzu v jeho různých vývojových stádiích. Podle charakteru působení je lze rozdělit na kontaktní, požerové nebo fumigantní. Insekticidy máme dvojího původu - přírodního a syntetického. Z přírodních insekticidů lze jmenovat např. nikotin, rotenon a pyrethrum. Ze syntetických pesticidů se dříve hojně využívaly chlorované insekticidy a to zejména DDT a HCH, ale vzhledem k jejich velké afinitě k tukům a perzistenci v životním prostředí byla většina z nich zakázána nebo nahrazena jinými pesticidy. Řadí se mezi POP_s [10, 17, 25].

Insekticidní vlastnosti DDT objevil Paul H. Müller roku 1939. Jako pesticid se začal používat hlavně během 2. světové války, kdy byl účinně aplikován proti různým typům infekčních onemocnění, hlavně proti tyfu a malárii. Po válce se začal vyrábět ve velkém měřítku a do počátku sedmdesátých let se jeho světová produkce odhaduje na 2 miliony tun. Kromě ničení parazitů našel široké uplatnění i v zemědělství, např. proti mandelince bramborové a dalším žravým škůdcům. Postupem času se většina druhů hmyzu stávala proti DDT rezistentní a bylo nutné stále zvyšovat jeho dávky a obnovovat postřiky, což prakticky vedlo až k zamoření celého civilizovaného světa, a to díky jeho kumulaci, převážně přes potravinový řetězec. Mezi prvními, kdo upozornil na škodlivé účinky DDT, byla Rachel Carson ve své knize „Silent Spring“. Autorka v ní dokumentovala, jak DDT a další pesticidy (dieldrin, toxafen,

heptachlor), užívané v té době masově v zemědělství, postupují vzhůru potravním řetězcem a ohrožují tak vyšší živočišné druhy, včetně jejich konzumenta, člověka. Slovem „tiché“ v názvu vyjadřuje negativní působení DDT na skořápky vajec ptáků. I když její kniha nebyla schopná zastavit výrobu pesticidů, rozhodně alespoň zvýšila zájem veřejnosti o problémy způsobené chemickým průmyslem, především z hlediska ochrany životního prostředí. Bývá také označována za podnět ke zrození environmentálního hnutí v USA [7, 26].

Použití DDT je v Evropě a USA zakázáno, avšak v některých rozvojových zemích se stále ještě v omezeném množství využívá. V Československu bylo zakázáno v roce 1974. Později byl tento insekticid zařazen také mezi teratogeny [7, 26].



Obr. č. 1: Paul H. Müller [27]



Obr. č. 2: Rachel Carson [28]

K dalším syntetickým insekticidům, které se využívají k ochraně rostlin, patří organofosfáty, karbamáty, benzoylmočoviny nebo syntetické pyrethroidy. Tyto látky jsou méně perzistentní. Nedochází k jejich výrazné kumulaci v životním prostředí a v tukové tkáni se ukládají jen velmi málo.

Insekticidy působí jako nervové jedy. Mechanismus účinku u organofosfátů a karbamátů spočívá v blokaci acetylcholinesterázy. U organofosfátů je vazba na enzym nevratná, u karbamátů vratná. U DDT se jedná o blokaci Na^+ kanálků, což vede k prodloužení depolarizace a vzniku křečí. Ostatní chlorované insekticidy (endrin, dieldrin, aldrin, endosulfan) inhibují GABA systém [9, 29, 30].

2.3 Herbicidy

Jako herbicidy jsou označovány látky, které jsou určeny k ničení nebo potlačení růstu plevelů. Herbicidy dnes patří k neužívanější skupině pesticidů. Nejčastěji mají selektivní účinek,

který je podmíněn řadou faktorů (např. chemická struktura, formulace aktivní látky, stádium vývoje rostliny). Neselektivní herbicidy ničí veškerou vegetaci a používají se na nezemědělských půdách. Podle způsobu působení je lze rozdělit na kontaktní, které ničí rostliny jen v místě dotyku a systémové, kdy herbicid proniká dovnitř tkáně a je rozváděn po celé rostlině. Mezi herbicidy zařazujeme také defolianty (způsobují odlistění rostlin) a desikanty (způsobují vysušení rostlin). Všechny dnešní přípravky jsou především organického původu, výjimku tvoří např. chlorečnan sodný neboli Travex [7, 25].

Mechanismus účinku herbicidů spočívá v narušení některého důležitého fyziologického procesu, který je nezbytný pro růst a vývoj rostliny. Zpravidla dochází k inhibici jednoho nebo více enzymů, které katalyzují reakce při biosyntéze organických sloučenin (např. aminokyselin, lipidů, karotenoidů). Lze uvést, že thiolkarbamáty zasahují do syntézy lipidů a tím mění integritu membrán. Triaziny zase působí na fotosyntézu, protože se vážou na D1 protein, který slouží k elektronovému transportu při světelné fázi fotosyntézy. Dalším příkladem mohou být fenoxycarboxylové kyseliny, které interagují s přirozenými fytohormony a tak ovlivňují růst rostliny.

Herbicidy se vážou na některé významné proteiny; místa navázání nazýváme místem účinku (působení). V současnosti existuje asi jen dvacet míst působení, i když v rostlinných buňkách probíhají tisíce různých biochemických reakcí. Toto vede často k opakovanému používání herbicidů působících na stejné místo účinku, což může mít za následek rezistenci k danému přípravku. Proto je důležité střídání herbicidů s různým místem účinku [30, 31].

Tabulka č. 2: Přehled některých organických herbicidů [14]

místo aplikace, způsob působení	skupina herbicidů	zástupce skupiny
aplikace na list, systémové	fosfonoaminokyseliny	glufosinát, glyfosát
	deriváty benzoové kyseliny	dicamba, chlorfenpropmethyl
	chlorované alifatické kyseliny	dalapon
	estery oxyfenoxykyselin	cykloxydim, diclofop-methyl
	fenoxyalkanové kyseliny	MCPA, MCPB, silvex
	kvarterní amoniové sloučeniny	diquat, paraquat
aplikace na list, kontaktní	benzonitrily	bromoxynil, dichlobenil, ionoxynil
	benzothiadiazoly	bentazon
	karbaniláty	fenmedifam
	cyklohexenony	cykloxydim, kletodim, sethoxydim
	dinitrofenoly	dinoseb
	difenylethery	acifluorfen, laktifen, nitrofen
aplikace do půdy	acetanilidy	alachlor, butachlor, metolachlor, propachlor
	amidy a anilidy	difenamid, naptalam
	karbaniláty a karbamáty	asulam, barban, bendiocarb
	dinitroaniliny	benefin, trifluralin
	pyridazinony a pyridinony	amitrol, dimethazon, fluridon, oxadiazon
	pyridinoxykyseliny a pikolinové kyseliny	clpyralid, picloram, triclopyr
	fenylmočoviny nebo jiné substituované močoviny	diuron, fenuron, metoxuron, siduron
	sulfonylmočoviny	amidosulfuron, chlorsulfuron, nikosulfuron, prosulfuron
	thiokarbamáty	butylát, cykloát, molinát, trifencarb
	triaziny	ametryn, atrazin, desmetryn, propazin, simazin, terbutryn
	uracily	bromacil, lenacil, terbacil

2.4 Fungicidy

Jsou pesticidní přípravky určené k boji proti nižším i vyšším houbám, které poškozují zejména kulturní rostliny, produkty zemědělské výroby a produkty průmyslové výroby (dřevo, konstrukce, atd.). Fungicidy mohou působit buď fungistaticky, kdy dochází k zabránění působení škůdce (např. přerušáním vývoje mycelia), nebo fungicidně, což má za následek zničení škůdce. Podle účinku rozeznáváme fungicidy kontaktní (povrchové) a systémové (vnitřní, selektivní), které pronikají do ošetřené rostliny a chrání ji po dobu perzistence účinné látky v rostlinném pletivu. Fungicidy se používají jako postřikové (pro ochranu rostlin), mořidla (pro preventivní ochranu osiva před půdními parazitickými houbami neboli sněťmi) a jako průmyslové (pro ochranu materiálů) [7, 9, 25].

Podle aktivních látek je lze dělit do několika různých skupin.

Tabulka č. 3: Přehled některých fungicidů [14]

způsob působení	skupina fungicidů	zástupce skupiny
kontaktní	dithiokarbamáty	maneb, mancozeb, thiram, zineb
	ftalimidy	folpet, captan
	dinitrosloučeniny	binapikryl
	organortuťnaté sloučeniny	fenylrtuť
	organocínové sloučeniny	fencín
	chlorované aromatické sloučeniny	chlorothalonil, quintozen
	kationaktivní tenzidy	dodín, glyodin
	ostatní	iprodion, procymidon
systémové	antibiotika	blasticidin, cyklohexamid, streptomycin
	benzimidazoly	benomyl, thiabendazol
	pyrimidiny	bupirimát, ethirimol
	piperaziny	triforin
	ostatní	metalaxyl, propikonazol, triadimefon

2.5 Vybrané pesticidy

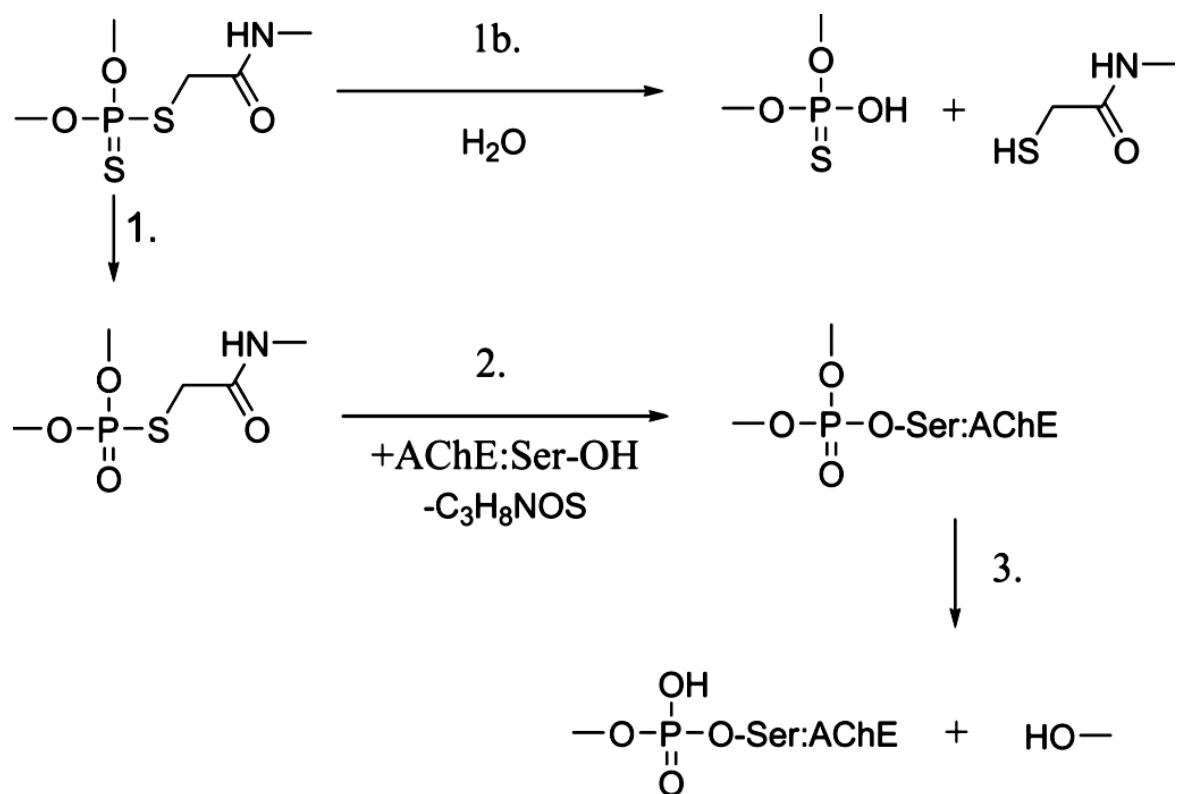
Tato práce je zaměřena na stanovení vybraných pesticidů pomocí plynové chromatografie, a to ve vzorcích vody. Sledovanými pesticidy jsou organofosfáty (chlorpyrifos, diazinon, parathion, dimethoate, phosmet) a karbamáty (carbofuran, aldicarb, methiocarb, pirimicarb a propamocarb).

U organofosfátů se jedná o estery kyseliny fosforečné, které buď obsahují síru (-thion) a cytochrom cyp450 je metabolizuje na aktivní derivát obsahující kyslík (-oxon), nebo mají rovnou kyslík přítomný v molekule. Obecně platí, že organofosfáty odstranily některé nevýhody organochlorových pesticidů a začaly je při aplikaci postupně nahrazovat. Považují

se za látky s vysokou akutní toxicitou, nehromadí se v ŽP ani v tukové tkáni. Působí jako kontaktní a požitkové jedy s časově omezeným reziduálním účinkem.

U karbamátů se jedná o deriváty karbaminové nebo karbamidové kyseliny. Mají nižší akutní toxicitu [25, 30].

Organofosfáty i karbamáty způsobují inhibici acetylcholinesterázy. Obecný mechanismus působení je založen na kovalentní vazbě (esterifikace) na serin v esterovém, neboli estratickém místě aktivního centra AChE a enzymu butyrylcholinesterazy (BuChE). Inhibice AChE vede k neschopnosti neuronů ukončovat synaptické vedení signálu v cholinergních nervových vláknech. Podle dávky a její distribuce v organismu pak dochází k patologickým změnám v centrální i periferní nervové soustavě, s možným vznikem cholinergní krize a život ohrožujících stavů spojených především se selháním dýchacího centra. Vazba organofosforových inhibitorů je za běžných podmínek nevratná. Karbamátové inhibitory jsou pseudoireverzibilní. Ve vodném prostředí dochází ke spontánní hydrolyze a k odštěpení karbamátového residua. Následkem toho se cholinesteráza stává opět aktivní a může plnit svou funkci [32].



Obr. č. 3: Mechanismus inhibice AChE látkou dimethoate³[32]

³Reakce 1 - aktivace dimethoatu na jeho kyslíkový analog (omethoat); reakce 1b - spontánní, nebo katalyzovaný rozklad dimethoatu ve vodném prostředí na dimethylfosfát; reakce 2 - esterifikace serinového hydroxylu v aktivním centru AChE; reakce 3 - spontánní dealkylace residua dimethoatu [32].

Tabulka č.4: Obecné vlastnosti vybraných pesticidů [33-35]

název	biologická účinnost	mechanismus účinku	rozsah účinku	způsob působení	vzhled (při pokojové teplotě)
ORGANOFOSFÁTY					
chlorpyrifos	insekticid, nematocid	inhibice AChE (ireverzibilní)	šírokospektr.	nesystémový	bílá, krystalická látka
diazinon	insekticid	inhibice AChE (ireverzibilní)	šírokospektr.	nesystémový	bezbarvá až tmavě hnědá kapalina
parathion	insekticid, akaricid	inhibice AChE (ireverzibilní)	šírokospektr.	nesystémový	světle žlutá až tmavě hnědá kapalina
dimethoate	insekticid	inhibice AChE (ireverzibilní)	šírokospektr.	systémový, kontaktní	šedá až bílá, krystalická látka
phosmet	insekticid	inhibice AChE (ireverzibilní)	šírokospektr.	nesystémový	bílá až růžová, pevná látka
KARBAMÁTY					
carbofuran	insekticid, akaricid, nematocid	inhibice AChE (reverzibilní)	šírokospektr.	kontaktní	bílá, krystalická látka
aldicarb	insekticid, nematocid	inhibice AChE (reverzibilní)	šírokospektr.	systémový	bílá, krystalická látka
methiocarb	insekticid, akaricid, moluskocid	inhibice AChE (reverzibilní)	šírokospektr.	nesystémový	bezbarvá až bílá, krystalická látka
pirimicarb	aficid	inhibice AChE (reverzibilní)	selektivní	systémový	modrozelená, pevná látka
propamocarb	fungicid	inhibice AChE (reverzibilní)	selektivní	systémový	bezbarvá až bílá, krystalická látka

Tabulka č. 5: Toxikologické vlastnosti vybraných pesticidů [33-35]

název	zařazení dle WHO	karcinogen	endokrinní disruptor	reprodukční, vývojová toxicita	LD₅₀ (orálně, krysy) [mg·kg⁻¹]
ORGANOFOSFÁTY					
chlorpyrifos	mírně nebezpečný	nepravděpodobný	podezření	neevidováno	82-270
diazinon	mírně nebezpečný	nepravděpodobný	podezření	ano	300-400
parathion	extrémně nebezpečný	možný	ano	neevidováno	2-30
dimethoate	vysoce nebezpečný	možný	ano	ano	28-30
phosmet	mírně nebezpečný	možný	neevidováno	neevidováno	113-369
KARBAMÁTY					
carbofuran	vysoce nebezpečný	nepravděpodobný	ano	neevidováno	5-13
aldicarb	extrémně nebezpečný	nepravděpodobný	ano	neevidováno	0,9-1
methiocarb	vysoce nebezpečný	neevidováno	neevidováno	neevidováno	15-35
pirimicarb	mírně nebezpečný	ano	neevidováno	neevidováno	150
propamocarb	bez rizika	neevidováno	neevidováno	neevidováno	2 000 - 2 900

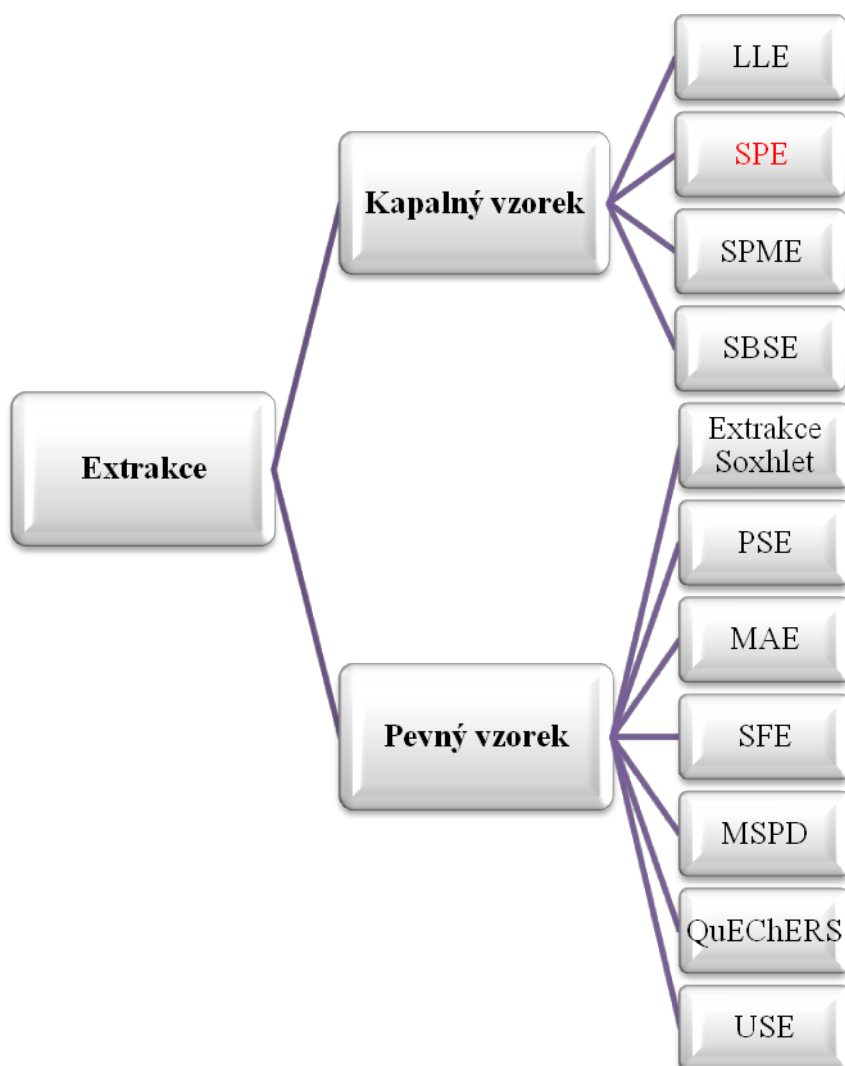
Tabulka č. 6: Ekotoxikologické vlastnosti vybraných pesticidů [33-35]

název	toxická pro ptáky	toxická pro ryby	toxická pro včely	perzistence v ŽP	rozpuštěnost ve vodě [mg·l⁻¹]
ORGANOFOSFÁTY					
chlorpyrifos	vysoce toxický	vysoce toxický	vysoce toxický	střední	2
diazinon	vysoce toxický	vysoce toxický	vysoce toxický	nízká	40
parathion	vysoce toxický	vysoce toxický	vysoce toxický	nízká	12,4
dimethoate	vysoce toxický	mírně toxický	vysoce toxický	nízká	39,8
phosmet	druhově specifická	druhově specifická	velmi toxický	nízká	25
KARBAMÁTY					
carbofuran	extrémně toxický	extrémně toxický	extrémně toxický	střední	320
aldicarb	vysoce toxický	mírně toxický	netoxický	střední	6 000
methiocarb	vysoce toxický	mírně toxický	vysoce toxický	nízká	27
pirimicarb	mírně toxický	netoxický	mírně toxický	nízká	2 700 000
propamocarb	toxický	mírně toxický	toxický	nízká	1 005 000

2.6 Stanovení vybraných pesticidů

Pesticidy se ve vzorcích vody většinou vyskytují v menších koncentracích, než vyžaduje přímé stanovení, a proto je nezbytné analyty předem zkoncentrovat. Nejběžnější způsob izolace těchto látek spočívá v jejich extrakci vhodným organickým rozpouštědlem, případně směsí rozpouštědel. Za úspěšnou izolační techniku považujeme takovou, která je schopná izolovat dané pesticidy s výtěžností blízkou 100 % a obsahující co nejmenší množství koextrahovaných látek izolovaných současně z matrice. Nejběžnější rozpouštědla používaná pro analýzu pesticidů jsou methanol, acetonitril, aceton, ethylacetát a hexan. Po extrakci je většinou nutné odstranit přirozené komponenty vzorku koextrahované spolu s analyty, např. pomocí gelové permeační chromatografie, adsorpční chromatografie nebo extrakce tuhou fází. Pro vlastní identifikaci a kvantifikaci pesticidů se používají různé separační techniky. V této práci bude pro identifikaci vybraných pesticidů použita plynová chromatografie v kombinaci s vhodným detektorem [15, 36].

2.6.1 Extrakční techniky



Obr. č. 4: Přehled extrakčních technik používaných pro extrakci pesticidů [36-48]

Tabulka č. 7: Popis extrakčních technik [8, 15, 36-38, 49-52]

extrakční techniky	princip	výhody	nevýhody
LLE	Principem je extrahovat složku z vodného roztoku do organického rozpouštědla, které je nemísitelné s vodou. Podmínkou je ustanovení fázové rovnováhy mezi kapalinami.	<ul style="list-style-type: none"> • jednoduchá instrumentace 	<ul style="list-style-type: none"> • časová náročnost • velká spotřeba rozpouštědel • riziko tvorby emulzí
SPE	Roztok analytu ve vodě se přivede do kontaktu s tuhým sorbentem, který silně sorbuje analyt a co v nejmenší míře ostatní složky roztoku. Poté je zachycený analyt uvolněn buď teplem, nebo elucí rozpouštědlem.	<ul style="list-style-type: none"> • rychlá extrakce • úspora rozpouštědel • široký výběr rozměrů kolonek a absorbentů 	<ul style="list-style-type: none"> • vyšší cena pevných fází, které se dají většinou použít pouze jednou
SPME	Jedná se o expozici malého množství extrakční fáze nadbytkem vzorku. Analyty z kapalně (příp. plynné) fáze jsou sorbovány na SPME vlákne, dokud není dosaženo rovnováhy.	<ul style="list-style-type: none"> • nevyžaduje rozpouštědla ani komplikované aparatury 	<ul style="list-style-type: none"> • může být zatížena relativně velkou chybou
SBSE	Extrakce je prováděna přímým ponořením magnetického míchadélka do kapalného vzorku. Magnetické míchadélko má skleněný povrch potažený velmi tenkým filmem z polydimethylsiloxanu (lze použít i jiné materiály), na kterém dochází k sorpci analytů.	<ul style="list-style-type: none"> • nevyžaduje rozpouštědla ani komplikované aparatury • inertnost PDMS 	<ul style="list-style-type: none"> • malá kapacita vzorkovače
SOX	Vzorek je umístěn do extrakční patrony, vložené do Soxhletova nástavce. Do destilační baňky se nalije vhodné rozpouštědlo, které se při zahřívání nad bod varu vypařuje. Páry jsou vedeny přes Soxhletův nástavec do chladiče, kde kondenzují a stékají do extrakční patrony, kde probíhá extrakce. Po dosažení určité hladiny rozpouštědla v patroně, přetéká, i s analyty, sifonem do baňky. Zde dojde znovu k odpaření a celý cyklus se opakuje.	<ul style="list-style-type: none"> • není nutná speciální instrumentace 	<ul style="list-style-type: none"> • dlouhá doba extrakce • velká spotřeba rozpouštědel • potřeba přечиštění

Tabulka č. 7: (pokračování)

extrakční techniky	princip	výhody	nevýhody
PSE	Využívá se zvýšené teploty a tlaku, což značně urychluje dobu extrakce. Lze použít teploty od 20 °C do 200 °C a tlaky od 4 do 20 MPa.	<ul style="list-style-type: none"> rychlá extrakce malá spotřeba rozpouštědel reprodukovatelnost automatizace 	<ul style="list-style-type: none"> přečištění
MAE	Extrakční činidlo, které obklopuje vzorek, se zahřívá působením mikrovln. Nejvíce se využívá frekvence okolo 2450 MHz.	<ul style="list-style-type: none"> krátká doba extrakce malá spotřeba rozpouštědel více vzorků najednou 	<ul style="list-style-type: none"> dlouhá doba chlazení ex. patron re-adsorpce látek během ochlazování nutné přečištění rozpouštědlo musí absorbovat mikrovlny
SFE	Extrakce pomocí kapaliny v superkritickém stavu. Nejčastěji se používá oxid uhličitý. Regulací teploty a tlaku lze měnit eluční sílu a hustotu superkritické kapaliny, což umožňuje dosáhnout vlastností organických rozpouštědel v rozsahu od chloroformu až po hexan.	<ul style="list-style-type: none"> úspora rozpouštědel rychlá extrakce není nutné přečištění automatizace 	<ul style="list-style-type: none"> důsledná optimalizace ex. podmínek obsah vody má vliv na účinnost
MSPD	V jednom kroku probíhá zároveň extrakční i purifikační fáze. Vzorek je rozmělněn a zhomogenizován ve třecí misce, kde dojde ke kompletnímu rozrušení vzorku, což umožní efektivnější smíchání s vhodným sorbentem. Směs je následně vložena do patrony a analyt se eluuje vhodným rozpouštědlem.	<ul style="list-style-type: none"> levná, rychlá metoda malá spotřeba rozpouštědel 	

Tabulka č. 7: (pokračování)

extrakční techniky	princip	výhody	nevýhody
QuEChERS	Metoda spočívá v extrakci analytů acetonitrilem v centrifugační kyvetě s přidavkem bezvodého MgSO_4 jako desikátoru a NaCl (pro zvýšení výtěžnosti polárních analytů). Po odstředění se z horní vrstvy odebere alikvotní podíl, ke kterému je přidán další MgSO_4 a sorbent PSA (primární-sekundární amin), který slouží k přečištění.	<ul style="list-style-type: none"> malá spotřeba rozpouštědel rychlá a levná extrakce jednoduchost vysoká výtěžnost 	
USE	Proudy v kapalině (mohou mít rychlost až 400 km.h^{-1}) naráží do pevné látky a umožňují tak průnik rozpouštědla do vzorku. Za vznik proudů je odpovědný ultrazvuk, který způsobuje expanzi a stlačování molekul média. Lze použít ultrazvukovou lázeň nebo sondy.	<ul style="list-style-type: none"> více vzorků najednou 	<ul style="list-style-type: none"> nutné přečištění velká spotřeba rozpouštědel

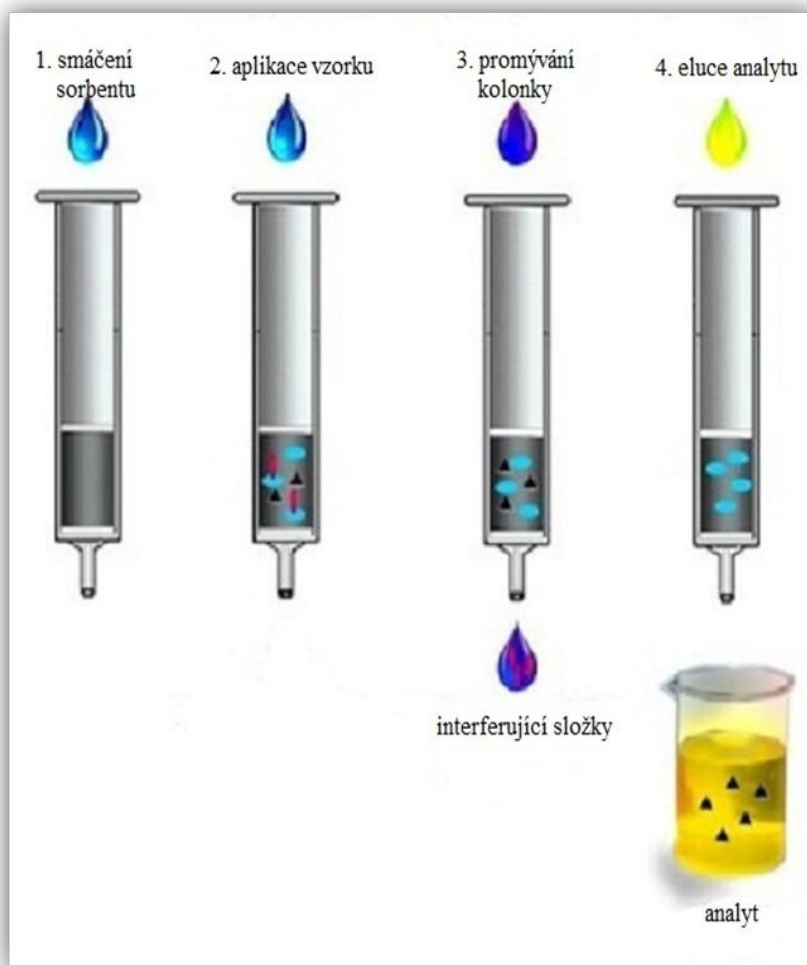
Na základě provedené literární rešerše (viz. Tabulka č. 8) bude pro izolaci vybraných pesticidů použita extrakce tuhou fází.

Tato extrakce získala široké uplatnění díky své jednoduchosti a úspornosti z hlediska času i spotřeby rozpouštědel. Umožňuje současné zpracování 12, 24 až 96 vzorků; metodu je možné automatizovat [53, 54].

2.6.1.1 Extrakce tuhou fází (SPE)

SPE se nejvíce využívá jako separační technika pro kapalnou matrici, případně pro přečištění extraktů. Může být použita i pro extrakci z pevné matrice, avšak v tomto případě je nutné nejprve převést vzorek do roztoku [54].

SPE je metoda, jejímž principem je přivést roztok analytu ve vodě do kontaktu s tuhým sorbentem, který silně sorbuje analyt a co v nejmenší míře ostatní složky roztoku. Princip sorbce je obdobný jako u kapalinové chromatografie, a proto je také nabídka sorbentů podobná jako u náplní kolon pro kapalinovou chromatografii. Následně je zachycený analyt uvolněn buď teplem nebo elucí rozpouštědlem. K extrakci tuhým sorbentem lze použít uspořádání statické nebo dynamické. Většinou se setkáváme s uspořádáním dynamickým, kdy roztok vzorku protéká přes sorpční kolonku malých rozměrů, která obsahuje vhodný sorbent. Průtok vzorku je umožněn buď gravitací, pozitivním tlakem (čerpadlo, injekční stříkačka), nebo negativním tlakem (vakuum) [15, 53, 55]. Proces samotné extrakce se skládá z několika kroků (viz. Obrázek č. 5):



Obr. č. 5: Schéma SPE, desorpce rozpouštědlem zapojení „off-line“ [56]

- Aktivace sorbentu, kdy se kolonka nejdříve promyje a to nejčastěji methanolem nebo acetonitrilem, abychom zajistili smáčení sorbentu s matricí vzorku (tzv. solvatace).
- Aplikace vzorku.
- Promývání kolonky za účelem selektivně eluovat nežádoucí sloučeniny z vázaných fází, aniž by byly eluovány analyty.
- Desorpce analytů z extrakční kolonky (desorpce rozpouštědlem – zapojení „off-line“ nebo „on-line“, desorpce teplem – zapojení „on-line“ s plynovým chromatografem) [15, 57].

Sorbenty

Na trhu je velké množství sorbentů a jejich volba pro danou extrakci je určována povahou analytu, který má být zkoncentrován. Mechanismus interakce mezi sorbentem a sledovaným analytem závisí na jejich hydrofobních, polárních a anorganických vlastnostech. Mezi běžně uplatňované interakce patří Van der Waalsovy síly (hydrofóbní „nepolární“), vodíkové vazby, dipól-dipólové interakce („polární“) a iontové interakce. Vedle interakcí analytu a sorbentu je třeba uvažovat také interakce mezi ostatními složkami vzorku a sorbentu, protože selektivita sorbentu není většinou nikdy taková, aby se na něm zachytil pouze analyt [15, 54, 55]. Sorbent může být uložen v kolonkách z polypropylenu nebo skla, případně může být slisován do disků (tzv. extrakční disky). Nevýhodou SPE kolonek je omezený průtok, možnost ucpání a vznik kanálků daný nehomogenitou sorbentu. Extrakční disky jsou podobné membránovým filtrům, jejich síla je ≤ 1 mm a průměr je v rozmezí 4 – 96 mm. V porovnání s SPE kolonkami mají větší průměr, povrch, průtok a nejsou náchylné k ucpávání. Současné použití několika kolonek nebo disků výrazně zkracuje čas potřebný na přípravu vzorku [53, 58].

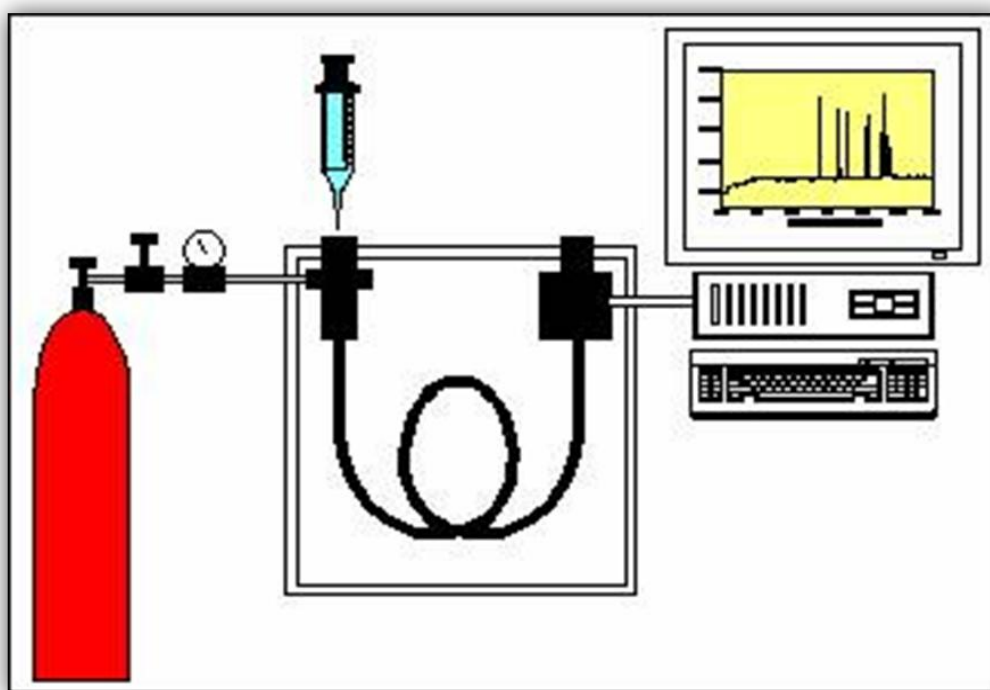


Obr. č. 6: Obrázek SPE kolonky a extrakčního disku [59]

Mohou se používat klasické sorbenty s fázemi od úplně nepolárních typů, jako jsou C_{18} , C_8 , až po sorbenty vysoce polární, sorbenty ionexového typu, polymerní sorbenty, speciální sorbenty (např. pro analýzu drog a léčiv). Mezi nejčastěji používané sorbenty pro analýzu pesticidů patří silikagel s chemicky vázanými alkyly (např. oktyl-silikagel, oktadecyl-silikagel), polymerní sorbenty (např. styren divinylbenzenový kopolymer – např. Envi-Chrom P) a někdy také grafitizovaný uhlík. V posledních letech se využívá vysoce zesíťovaný styren-divinylbenzen jako je např. LiChrolut, Styrosorb a Macronet Hypersol, Isolute ENV a HYSphere-1. Tyto sorbenty mají vyšší stupeň zesíťování (tzn. vysokou pórovitost materiálu), což zvyšuje jejich specifický povrch a umožňuje lepší interakce mezi analytem a sorbentem [17, 60].

2.6.2 Plynová chromatografie

Chromatografie je separační proces založený na rozdělování sloučenin mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze – pohyblivou (tzv. mobilní) a nepohyblivou (tzv. stacionární). U plynové chromatografie je mobilní fází plyn (tzv. nosný plyn). Plynová chromatografie se uplatňuje při dělení, identifikaci a stanovení všech složek, které lze převést bez rozkladu do plynné fáze. Nachází široké uplatnění jak ve výzkumných, tak i v provozních laboratořích různých odvětví chemického, potravinářského a farmaceutického průmyslu a ve zdravotnictví. Je vhodná pro analýzu vzorků ze životního prostředí, neopomenutelná je její aplikace při monitorování kvality životního prostředí (stanovení pesticidů, PCB, PAU, atd.). V porovnání s kapalinovou chromatografií má v komplexním uspořádání větší separační účinnost, selektivitu, rozlišení a citlivost. Může probíhat buď jako chromatografie jednodimenzionální, při které se používá jeden separační mechanismus (tzn. jeden typ stacionární fáze a jedna mobilní fáze), nebo vícedimenzionální chromatografie, která využívá spojení dvou a více chromatografických kolon pro lepší rozlišení vzorku [61-63].

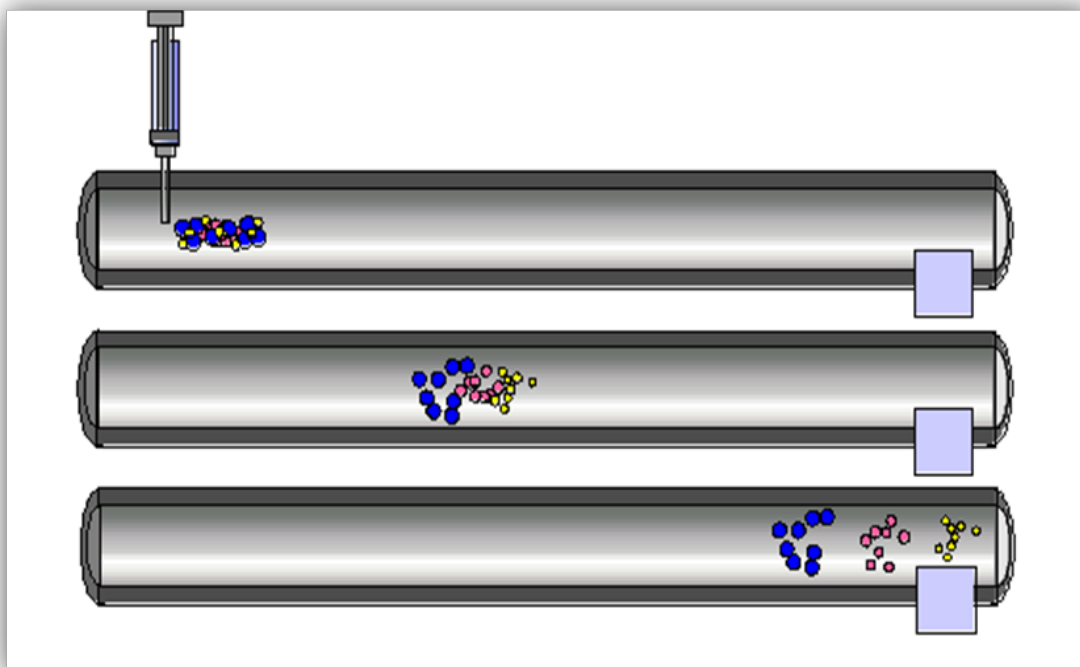


Obr. č. 7: Schéma plynového chromatografu [64]

Princip této metody spočívá v aplikaci vzorku obsahujícího analyt do vyhřívaného prostoru injektoru, kde dojde k odpaření. Stanovované látky musí být proto těkavé a teplotně stabilní. Jejich bod varu by při atmosférickém tlaku neměl být vyšší než 360 °C [62]. Molekuly vzorku jsou poté unášeny nosným plynem na kolonu podle bodu varu a jejich volatility. V injektoru je umístěna skleněná vložka (tzv. liner), kterou lze v případě znečištění snadno vyměnit. Linery se liší svým tvarem, tj. podle toho, k jakému typu nástřiku se používají. Je možné volit tyto způsoby nástřiku:

- Split nástřik se používá pro hodně koncentrované roztoky, na kolonu se dostane méně než 10 % vzorku.
- Split-less nástřik, vhodný pro zředěné roztoky, na kolonu se dostane asi 80 % vzorku.
- PTV nástřik, jedná se o programování teploty těla injektoru, který obsahuje vložku s chromatograficky aktivní náplní. K odstranění rozpouštědla a nízkomolekulárních sloučenin dochází ještě před analýzou.
- On-column, jedná se o nástřik přímo do kapilární kolony.

V koloně se analyty sorbují na stacionární fázi (buď se rozpouštějí v zakotvené fázi (GLC) nebo se adsorbují na pevný sorbent (GSC). Zdržení ve stacionární fázi je řízeno hodnotami tlaku par a afinitou dané látky ke stacionární fázi, přičemž mobilní fáze nemá přímý vliv na separaci. Z kolony nakonec vystupují jednotlivé separované látky. Látky, které se sorbují málo, vystupují z kolony nejdříve a mají nejkratší retenční časy. Z kolony vstupují látky do detektoru, jehož signál odpovídá změnám jejich koncentrace v nosném plynu vystupujícím z kolony [61-63].



Obr. č. 8: Mechanismus separace v GC [65]

Jako nosný plyn se nejčastěji používá dusík, helium, argon nebo vodík [63, 68].

Kolony pro plynovou chromatografii jsou náplňové a kapilární. Náplňové kolony mohou být zhotoveny např. z nerezové oceli, skla, Al, Cu, Ni. Jejich délka bývá 1 až 5 m a průměr 2 až 6 mm. Pro GLC je stacionární fází kapalina, kterou je pokryt inertní materiál (nosič – např. křemelina). Stacionární fáze tvoří 1 - 10 hm.% nosiče a může být nepolární (OV-1, dimethylsilikon), mírně polární (OV-11, fenyl-methyl-dimethylsilikon, 35 % fenylu), středně polární (OV-25, fenyl-methyl-dimethylsilikon, 75 % fenylu) nebo polární (Carbowax, PEG). Pro adsorpční chromatografii se jako stacionární fáze používá např. silikagel, alumina nebo adsorbenty na bázi polymerů. Tyto kolony se již dnes pro stopovou a ultrastopovou analýzu nepoužívají [63].

Dalším typem jsou kapilární kolony. V GC se používají křemenné kapiláry, kde je stacionární fáze vázána na vnitřní povrch kapiláry ve formě tenkého filmu. Jsou až stokrát účinnější než kolony náplňové. Délka kolon se pohybuje v rozmezí 10 až 100 m, vnitřní průměr mezi 100 až 530 μm a vrstva stacionární fáze může mít šířku 0,1 až 10 μm . Typy kapilárních kolon:

- PLOT – vrstvička pevného sorbentu je na vnitřní straně
- SCOT – vrstvička nosiče na vnitřní stěně kapiláry smočená stacionární fází
- WCOT – tenký film SF vytvořený přímo na vnitřním povrchu kolony [57, 62, 63].

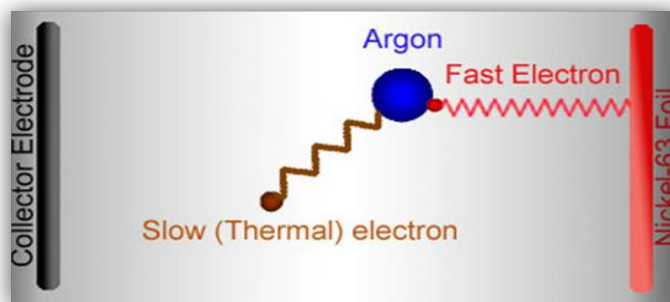
Analyty jsou v plynové chromatografii detekovány pomocí detektorů. Jedním z prvních používaných detektorů byl detektor elektronového zachytu (ECD). Je vysoce citlivý na látky obsahující heteroatomy (především halogeny), a proto dodnes zůstává široce používaným detektorem při analýze pesticidů (hlavně organochlorových) a PCB. Další detektory, které se používají pro stanovení pesticidů, jsou termoionizační detektor (NPD), plamenově-ionizační (FID), plamenově-fotometrický (FPD) nebo hmotnostně spektrometrický (MS) [17, 66].

Jak je uvedeno v Tabulce č. 6 lze pro stanovení pesticidů využít i orthogonální dvoudimenzionální plynovou chromatografii (GC \times GC).

2.6.2.1 Detektor elektronového zachytu

Je to jeden z nejvíce selektivních detektorů v plynové chromatografii s vysokou citlivostí; proto je vhodný zvláště pro stopovou analýzu. Využívá schopnost eluovaných látek vytvořit negativní ion zachycením nízkoenergetického elektronu. ECD se skládá ze dvou elektrod, emitoru a kolektoru [17, 67].

Zdrojem záření (tzv. emitor) je β -zářič (např. ^{63}Ni , ^3H), který emituje elektrony o relativně vysoké kinetické energii. V případě rychlých elektronů by však nedocházelo k žádné interakci s organickými, anorganickými atomy nebo molekulami, vzhledem k jejich vysoké kinetické energii. Proto se pro elektronový záchyt musí tyto elektrony zpomalit.



Obr. č. 9: Zpomalení elektronů uvnitř detektoru [67]

Ke zpomalení slouží plyny jako je např. dusík, nebo směs argon-methan. Po nárazu rychlých elektronů na molekuly plynu dojde ke vzniku volných pomalých elektronů, které vytvářejí rovnoměrný měřitelný proud [57, 67].

Po průchodu plynu z chromatografické kolony, který obsahuje molekuly s vysokou elektronovou afinitou, dojde k zachycení elektronů a měřený ionizační proud se sníží. Snížení elektronového toku je přímo úměrné množství elektronegativní složky stanovované látky obsažené ve vzorku [61, 67].

H																		He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne	
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar	
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr	
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe	
Cs	Ba	Lu	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn	

Obr. č. 10: Elektronové afinity v periodické tabulce prvků [67]

Detektor elektronového zachytu je velmi citlivý na látky s vysokou atomovou elektronovou afinitou, které často vykazují i vysokou elektronegativitu. Velmi dobrá je tato detekce i pro látky s vysokou elektronovou afinitou dané chemické skupiny. Proto se výborně hodí pro analýzu látek obsahujících halogenový atom v molekule, dále pak pro látky obsahující např. kyano skupinu ($-\text{CN}$) a nitro skupinu ($-\text{NO}_2$). Tento detektor je vhodný také pro organokovové sloučeniny, sloučeniny s fosforem (organofosfáty) a sírou, karbamáty, karbonylové sloučeniny, alkylhalogenidy, nitrily aj. [63, 67].

Proto je ECD intenzivně používán při analýzách složek životního prostředí, zpravidla v kombinaci s nějakým univerzálním detektorem [57].

2.6.2.2 Hmotnostně spektrometrický detektor

Hmotnostní spektrometrie se sice může používat jako samostatná technika, ale ve většině případů se vyskytuje v tandemech se separačními technikami (např. GC, HPLC, kapilární elektroforéza), ve kterých zastupuje roli detektoru. V porovnání s klasickými detektory poskytuje informace o struktuře analytu. Spojení s plynovou chromatografií není v současnosti problémem. Důvodem je nízký průtok nosného plynu v kapilárních kolonách a díky výkonným vakuovým systémům neohrožuje kvalitu vakua v hmotnostním spektrometru. Analyty opouští kolony v plynném stavu, a proto lze použít tvrdé ionizační techniky, jakou je například nejčastěji používaná elektronová ionizace [48, 66, 68].

Jednotlivé složky analytu postupně opouštějí GC kolonu a přes vyhřívanou restriční kapiláru vstupují do hmotnostního spektrometru, kde v iontovém zdroji dochází k jejich ionizaci. Vzniklé ionty jsou poté urychleny směrem k analyzátoru, kde jsou rozděleny podle jejich

poměru hmotnosti k náboji (m/z) a následně jsou detekovány. Výstupem je hmotnostní spektrum, tj. závislost intenzity na poměru m/z [48, 49, 66].

Hmotnostní analyzátoři mohou pracovat ve 2 základních módech – SCAN a SIM. SCAN mód registruje hmotnostní spektra v nastaveném rozsahu m/z (využití pro identifikaci), naopak v SIM módu se sleduje intenzita jednoho nebo několika vybraných iontů v čase. SIM mód poskytuje o 2 řády nižší mez detekce, a proto má dobré využití pro ultrastopovou analýzu [69].

2.6.2.3 GC×GC-TOF-MS

Dvoudimenzionální plynová chromatografie byla poprvé zveřejněna v roce 1991, kdy se tato metoda velmi úspěšně osvědčila pro analýzu komplexních vzorků. Tato technika využívá dvě kolony lišícími se složením stacionárních fází. Ve většině aplikací má primární kolona standardní rozměry, tj. $(15 - 30) \text{ m} \times (0,25-0,32) \text{ mm ID}$, $(0,1 - 1) \mu\text{m}$ a nepolární nebo slabě polární stacionární fázi. K separaci dochází podle bodu varu. Sekundární kolona je užší a kratší, typické rozměry jsou $(0,5 - 2) \text{ m} \times 0,1 \text{ mm ID}$, $0,1 \mu\text{m}$; obsahuje většinou polární stacionární fázi. Zde převažuje dělení podle polarit [71].

Kolony jsou spojeny prostřednictvím modulátoru. Během let bylo vyvinuto mnoho typů modulátorů, z nichž většina je založena na kryogenní fokusaci a tepelné desorpci. Modulace pak probíhá zamražením a opětovným zahřátím, čímž dochází k postupnému dávkování vzorku z primární kolony na kolonu sekundární. Zde probíhá „blesková“ separace v řádech několika sekund, která je dokončena dříve, než je provedena další modulace. Typický interval modulace se pohybuje v sekundách (nejčastěji 2 – 5 s). Každý pík eluující se z primární kolony je modulován několikrát, čímž je zachováno chromatografické rozlišení z první dimenze [42, 70].

Výsledkem je kompletní separace vzorku dvěma odlišnými mechanismy, tj. ve dvou dimenzích. Každá sloučenina tak bude charakterizována dvěma retenčními časy a místo jednorozměrného chromatogramu získáme dvourozměrný vrstevnicový diagram, ve kterém X, Y pozice daného píku odpovídají elučnímu času dané látky na první a na druhé koloně [70]. Vzhledem k extrémně úzkým píkům, které vychází ze sekundární kolony, musíme mít detektor schopný rychlého sběru dat (100 Hz a více) a s minimálním vnitřním objemem. Tomuto požadavku odpovídají plamenový ionizační detektor (FID) a detektor elektronového záchytu (ECD). Použitím těchto detektorů však přicházíme o možnost získání informací o struktuře látky. Proto se jako velice vhodné jeví použití systému MS-TOF, které poskytuje dostatečně rychlou detekci i potřebné informace o struktuře látky. Tento detektor je schopný poskytnout až 500 hmotnostních spekter za sekundu, a to bez omezení rychlosti sběru dat [71, 72].

Tato metoda poskytuje větší kapacitu píků v porovnání s běžnou GC a zvýšení poměru signál/šum. Tyto vlastnosti umožňují analýzu složek, které bylo dříve obtížné oddělit u vzorků ve složitých maticích (např. analýza stopových kontaminantů v životním prostředí, v potravinách nebo ve vzorcích z průmyslu) [71, 72].

Tabulka č. 8: Příklady stanovení organofosfátů a karbamátů [39-48]

matrice	analyty	extrakce	ex. činidlo	čištění	analýza	kolona	teplotní program
voda, sediment, biota	organofosfáty	LE	DCM, A:H	GPC (Bio-beads), Na ₂ SO ₄	GC/ECD/NPD	J&W DB-5 (30 m×0,25 mm×0,25 μm) SP-608	80 °C po 2 min, 10 °C/min do 160 °C, 3 °C/min do 265 °C po 15 min
voda	organofosfáty, pyretroidy, imidazoly, karbamáty, tetraziny	SPME (PA 85μm)	-	-	GC/MS	Restek Rtx®-1 MS (30 m×0,25 mm×0,25 μm)	60 °C, 25 °C/min do 170 °C, 6 °C/min do 290 °C po 1 min
pšenice, broskve, salát	organofosfáty, karbamáty, pyretroidy, triazoly, sulfaamidy	LE	AC	SPE	GC/ECD, GC/MS	AT-5 ms (30 m×0,25 mm×0,25 μm) VF 5 ms (30 m×0,25 mm×0,25 μm)	80 °C po 2 min, 35 °C/min do 170 °C po 13 min, 10 °C/min do 230 °C po 7 min, 10 °C/min do 300 °C, po 3 min
tabák	organofosfáty, organochlor.	LLE	EtAC		GC × GC- TOF-MS	prim. kolona Restek Rtx-1 (30 m×0,25 mm×0,25 μm) sek. kolona Restex Rtx-200 (1 m×0,18 mm×0,18 μm)	prim. t. 40 °C po 1 min, 40 °C/min do 120 °C, 5 °C/min do 290 °C sek.t. 5 °C pozitivní posun od primárního termostatu
rajčata, jablka, mrkev, zelí	organofosfáty, karbamáty	LE	AC	SPE (s. PSA)	LC/MS	VP-ODS (150 mm×2,0 mm×5 μm)	-

Tabulka č. 8: (pokračování)

matrice	analyty	extrakce	ex. činidlo	čištění	analýza	kolona	teplotní program
listová zelenina	insekticidy, fungicidy	LE	AN	SPE(GCB/PSA)	GC/MS	SPB-5 (30 m×0,25 mm×0,25 µm)	80 °C, 8 °C/min do 200 °C 1 °C/min do 210 °C 1,2 °C/min do 270 °C 110 °C po 1 min,
vlasý	organofosfáty, organochlorované pesticidy	LLE	EtAC	SPE	GC/ECD	HP-5 (30 m×0,25 mm×0,25 µm)	15 °C/min do 180 °C 5 °C/min do 250 °C po 1 min, 25 °C/min do 300 °C
brokolice, kapusta, květák, zelí	organofosfáty, karbamáty, amidy, pyrimidy, imidazoly, triazoly	MSPD	H:AC (8:2)	silikagel, Na ₂ SO ₄	GC/ECD/NPD	HP-5 (30 m×0,32 mm×0,5 µm)	120 °C, 16 °C/min do 190 °C, 8 °C/min do 230 °C 18 °C/min do 285 °C po 10 min
vepřové, hovězí, kuřecí maso	organofosfáty, karbamáty, pyrethroidy	ASE	AN	GPC (Bio-Beads S-X3)	GC/MS	J&W DB-5 (30 m×0,25 mm×0,25 µm)	60 °C, 30 °C/min do 100 °C 3 °C/min do 220 °C po 3 min, 10 °C/min do 280 °C po 10 min
jablečný džus	organofosfáty, karbamáty, pyrethroidy, organochlor.	MSPD	H:DCM	-	GC/MSD	DB-1701 (30 m×0,32 mm×0,25 µm)	60 °C po 1 min, 25 °C/min do 160 °C, 5 °C/min do 250 °C, 10 °C/min do 300 °C

Pozn: DCM – dichlormethan, AC – aceton, H – hexan, AN – acetonitril, EtAC - ethylacetát

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje, pracovní pomůcky, chemikálie, standardy

3.1.1 Přístroje a zařízení

- analytické váhy SCALTEC SPB31 (Scaltec Instrument GmbH, Německo)
- ultrazvuková vodní lázeň; Teson 4 (Tesla, Česká republika)
- SPE extraktor Baker, model spe - 12G, s vakuovou pumpou Barmany, Co., USA
- odpařovací zařízení EVATERM (Labicom, Česká republika)
- zařízení pro přípravu MilliQ vody Millipore QGARD
- plynový chromatograf Agilent 6890 N (Agilent, USA)
- hmotnostní spektrometr Pegasus IVD, (Leco, USA)

3.1.2 Pracovní pomůcky

- kádinky
- odměrné baňky (10 ml, 5 ml)
- analytické nálevky
- odpařovací baňky (250 ml)
- filtrační papír (pro kvalitativní analýzu KA4)
- mikropipety
- vialky
- další běžné laboratorní vybavení

3.1.3 Chemikálie

- aceton (for LC, Merck, Německo)
- dichlormethan (Merck, Německo)
- ethylacetát (Merck, Německo)
- methanol (for LC-MS, Bioslove BV, Francie)
- isooktan (Merck, Německo)

3.1.4 Standardy

- chlorpyrifos (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo)
- diazinon (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo)
- parathion (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo)
- dimethoate (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo)
- phosmet (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo)
- carbofuran (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo)
- aldicarb (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo)
- methiocarb (ChemService, USA)
- pirimicarb (ChemService, USA)
- propamocarb (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo)

3.1.4.1 Příprava kalibračních roztoků

Z každého standardu bylo naváženo 0,01 g do 10 ml odměrné baňky a rozpuštěno v acetonu. Z takto připraveného zásobního roztoku byly postupným ředěním acetonem připraveny

roztoky o koncentracích 1 000, 500, 300, 250, 200, 150, 120, 100, 70, 50, 30, 10 a 5 ng·ml⁻¹. Pro sestavení kalibračních křivek byly použity roztoky o koncentracích 150 - 5 ng·ml⁻¹.

3.2 Optimalizace SPE pro extrakci vybraných pesticidů

Optimalizace postupu přípravy vzorku je důležitým krokem pro dosažení co nejvyšší účinnosti metody. Pro další experimenty prováděné v rámci diplomové práce byl optimalizován typ sorbentu v kombinaci s různými elučními činidly. Vhodné podmínky extrakce byly zjišťovány na modelových vzorcích deionizované vody cíleně kontaminované pesticidy. Pracovní roztok byl připraven tak, aby se v něm každý analyt vyskytoval o koncentraci 1 000 ng·ml⁻¹. Takto připravené vzorky byly přefiltrovány a analyzovány stejně jako vzorky reálné.

Použité SPE kolonky:

- Supelclean ENVI-18 (1g/6ml, Supelco, Německo). Tyto kolonky byly speciálně vyvinuty a testovány pro aplikace z oblasti životního prostředí podle požadavků US EPA. Sorbentem je polymerně vázaná oktadecylová fáze (17% C). Vysoké procento vázaného uhlíku zvyšuje sorpční kapacitu a zaručuje zvýšené výtěžky. Zároveň zaručuje lepší stabilitu sorbentu při práci v extrémních podmínkách pH. Používají se pro analýzy herbicidů, fungicidů a pesticidů v odpadech
- HLB (Oasis, USA). Sorbentem je zde kopolymer divinylbenzen/N-vinylpyrrolidin.

Tabulka č. 9: Kombinace sorbentů a elučních činidel

sorbent	eluční činidla						
C18	Met-DCM (1:1)	Met-EtAC (1:1)	AC	Met	AC-Met (1:1)	AC-Met (2:1)	Met-AC (2:1)
HLB	-	-	-	-	-	AC-Met (2:1)	Met-AC (2:1)

Pozn: Met-DCM – methanol-dichlormethan, Met-EtAC – methanol-ethylacetát, AC – aceton, AC-met – aceton-methanol

3.2.1. Postup SPE

- příprava kolonky: 6 ml elučního činidla, 3 ml deionizované vody
- 250 ml vzorku vody
- promytí kolonky: 2 ml deionizované vody
- sušení proudem vzduchu pomocí vakuové pumpy (5 min)
- eluce: 5 ml elučního činidla
- získaný eluát byl sbírán do 12 ml vialek a následně byl odpařen pod dusíkem, rozpuštěn v 1 ml acetonu a zfiltrován přes 0,45 µm (PTFE) do vialky.

Pro zjišťování účinnosti uvedených metod SPE byly použity již optimalizované podmínky analýzy na přístroji Pegasus IV D.

3.3 Odběr, zpracování a analýza vzorků

Vzorky odpadní vody (jednalo se o 24 hodinové vzorky) byly odebírány po dobu 14 dní (od 18. 4. 2012 do 1. 5. 2012) z přítoku i odtoku na velkokapacitní ČOV v Brně – Modřicích. Tato čistírna slouží k čištění odpadních vod přiváděných systémem kanalizačních stok z

města Brna a ve stále větší míře prostřednictvím soustavy čerpacích stanic i z širokého okolí Brna. Vzorky byly odebírány do tmavých skleněných lahví (o objemu 1 litr).

Vzorky povrchové vody byly odebírány 22. 4. 2012 na řece Svratce, přibližně v 15:00. Umístění odběrových míst bylo zhruba 1 km před ČOV, 500 m za ČOV a přímo na odtoku z ČOV. Vzorky byly odebírány do tmavých skleněných lahví (o objemu 1 litr) a uchovány v chladu při 4 °C až do zpracování v laboratoři.

3.3.1 Úprava vzorků, extrakce

Po dopravě do laboratoře byly vzorky zfiltrvány přes filtrační papír pomocí vysokotlaké filtrace. Filtrát byl převeden do kádinek o objemu 250 ml a byla provedena extrakce tuhou fází.

3.3.1.1 Postup SPE

- příprava kolonky: 6 ml směsi aceton-methanol (2:1), 3 ml deionizované vody
- 250 ml vzorku vody
- promytí kolonky: 2 ml deionizované vody
- sušení proudem vzduchu pomocí vakuové pumpy (5 min)
- eluce: 5 ml směsi aceton-methanol (2:1)
- získaný eluát byl sbírán do 12 ml vialek a následně byl odpařen dusíkem, rozpuštěn v 1 ml acetonu a zfiltrován přes 0,45 µm (PTFE) do vialky.

3.3.2 Analýza vzorků

Vzorky byly analyzovány dvěma metodami, a to plynovou chromatografií ve spojení s hmotnostním spektrometrem s detekcí doby letu (GC/MS-TOF) na přístroji Pegasus IV D a plynovou chromatografií s detektorem elektronového záchyty (GC/ECD) na přístroji Agilent 6890 N. Identifikace byla prováděna na základě porovnávání retenčních časů standardů pesticidů s retenčními časy analytů detekovaných v reálných vzorcích vody. Pro kvantifikaci byla zvolena metoda kalibračních křivek, které byly sestaveny pro každý sledovaný analyt jako závislost plochy píku na koncentraci. Kalibrační křivky byly pravidelně kontrolovány.

3.3.2.1 Nastavení GC/MS-TOF

- primární kolona: Rxi-5Sil MS (29 m x 0,25 mm, 0,25µm vrstva filmu)
- sekundární kolona: BPX-50 (1,4 m x 0,1 mm, 0,1 µm vrstva filmu)
- **Plynový chromatograf:**
 - nástřik: 1 µl, 250 °C, splitless
 - nosný plyn: Helium
 - průtok nosného plynu: 1 ml·min⁻¹
 - teplotní program: počáteční teplota 45 °C, konstantní po 2 min; poté nárůst teploty 40 °C/min do 220 °C; a následně 5 °C/min do 260°C
 - teplota transfer line: 270 °C
 - celková doba analýzy: 14, 375 min
- **Hmotnostní spektrometr:**
 - rozsah m/z: 40 - 600

- rychlost sběru dat: 5 spekter/s
- napětí na detektoru: 1 700 V
- teplota iontového zdroje: 250 °C

Tabulka č. 10: Přehled sledovaných pesticidů a jejich hodnoty m/z , které byly použity pro kvantifikaci

analyty	m/z
chlorpyrifos	197
diazinon	137
parathion	109
dimethoate	125
phosmet	160
carbofuran	164
aldicarb	86
methiocarb	168
pirimicarb	166
propamocarb	188

3.3.2.2 Nastavení GC/ECD

- kolony: HT-8 (50 m×0,22 mm×0,25 μ m)
DB-17 MS (60 m×0,25 mm×0,25 μ m)
- nástřik: 1 μ l, 65 °C, splitless
- nosný plyn, průtok: H₂, 1,1 ml·min⁻¹
- make-up plyn, průtok: N₂, 20 ml·min⁻¹
- teplota detektoru: 310 °C
- teplotní program: počáteční teplota 45 °C, konstantní po 2 min; poté nárůst teploty 40 °C/min do 220 °C; a následně 5 °C/min do 270 °C, konstantní po 4 min
- celková doba analýzy: 20,38 min

3.3.3 Ukázka analýzy vzorků pomocí dvoudimenzionální chromatografie

Pomocí GC × GC-TOF-MS byly analyzovány vzorky povrchové vody (odebíraný před ČOV a za ČOV). Dále byla tato metoda použita na analýzu směsi standardů o koncentraci 500 ng·ml⁻¹. Jednalo se pouze o vyzkoušení této metody, a proto je ve výsledcích uvedeno jen kvalitativní hodnocení sledovaných analytů.

3.3.3.1 Nastavení GC × GC-TOF-MS

- primární kolona: Rxi-5Sil MS (29 m x 0,25 mm, 0,25 μm vrstva filmu)
- sekundární kolona: BPX-50 (1,4 m x 0,1 mm, 0,1 μm vrstva filmu)
- **Plynový chromatograf:**
 - nástřik: 1 μl, 250 °C, splitless
 - nosný plyn: Helium
 - průtok nosného plynu: 1 ml·min⁻¹
 - teplotní program na primární koloně: počáteční teplota 45 °C, konstantní po 2 min; poté nárůst teploty 40 °C/min do 220 °C; a následně 5 °C/min do 260 °C
 - teplotní program na sekundární koloně: počáteční teplota 50 °C, konstantní po 2 min; poté nárůst teploty 40 °C/min do 225 °C; a následně 5 °C/min do 265 °C
 - modulátor: + 20 °C
 - hot pulse: 0,4 s
 - cool time: 0,6 s
 - celková doba analýzy: 14, 375 min
- **Hmotnostní spektrometr:**
 - rozsah m/z: 50 - 600
 - rychlost sběru dat: 100 spekter/s
 - napětí na detektoru: 1 600 V
 - teplota iontového zdroje: 250 °C

Tabulka č. 11: Retenční časy sledovaných pesticidů na primární a sekundární koloně

analyty	RT [s] primární kolona	RT [s] sekundární kolona
aldicarb	399	0,95
carbofuran	459	1,11
propamocarb	479	1,13
methiocarb	529	1,4
dimethoate	591	1,9
diazinon	603	1,56
phosmet	625	0,03
pirimicarb	627	1,88
chlorpyrifos	701	0,00
parathion	711	0,07

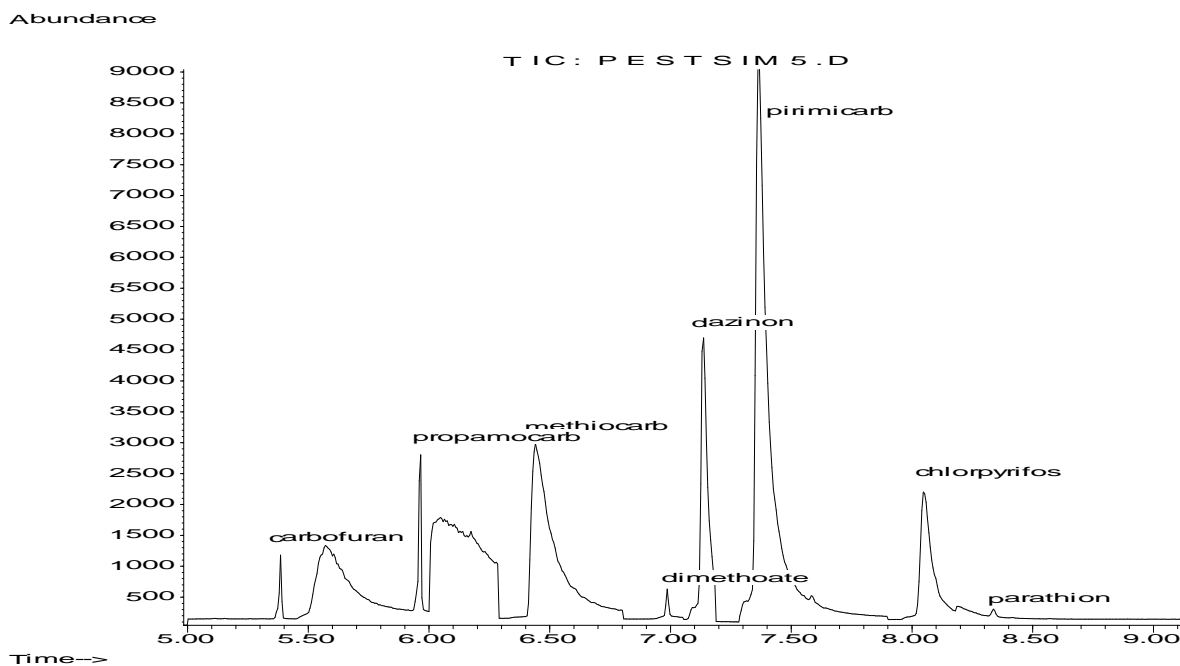
4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Optimalizace podmínek analýzy

Z důvodu nefunkčnosti přístroje Pegasus IV D byly podmínky analýzy optimalizovány na přístroji Agilent 6890N s hmotnostním detektorem. Optimalizace byla prováděna pomocí směsi standardů o koncentraci $1\,000\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Konečného stanovení vhodných podmínek bylo dosaženo zhruba po 15 měřeních, při kterých se měnily podmínky analýzy, zejména teplotní program. Každé měření trvalo zhruba 20 až 40 minut, z čehož je patrné, že se jedná o časově náročnou proceduru. Bylo třeba pracovat v SIM modu, kdy se zaznamenávají pouze nastavené hmotnosti charakteristické pro sledovaný analyt, čímž se zvýší přehlednost výsledného chromatogramu. Konečné nastavení teplotního programu bylo poté použito i u přístroje Agilent 6890N s detektorem elektronového záchytu a na přístroji Pegasus IV D, kde byl ještě upravován čas analýzy. Výsledné nastavení obou přístrojů je uvedeno v kapitole 3.3.2.1. a 3.3.2.2.

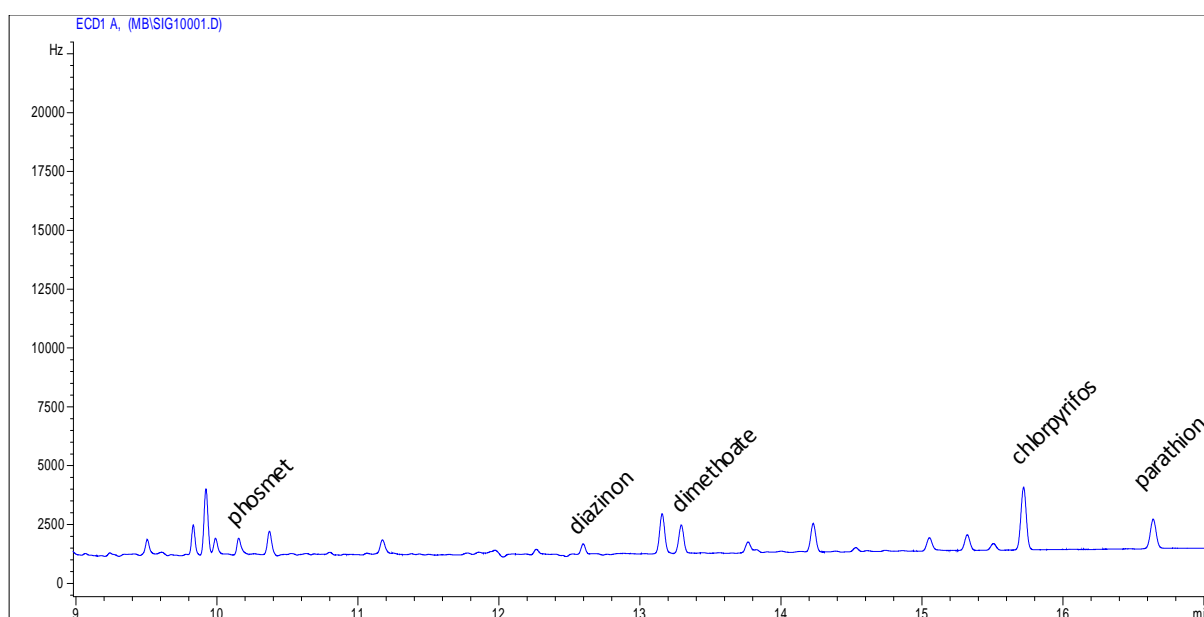
4.1.1 Nastavení GC/MS

- kolona: DB-5 MS ($20\text{m}\times 0,18\text{mm}\times 0,18\mu\text{m}$)
- nástřik: $1\,\mu\text{l}$, $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, splitless
- nosný plyn, průtok: He, $1,1\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$
- teplota iontového zdroje: $230\text{ }^{\circ}\text{C}$
- teplota kvadrupolu: $150\text{ }^{\circ}\text{C}$
- teplotní program: počáteční teplota $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, konstantní po 2 min; poté nárůst teploty $40\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do $220\text{ }^{\circ}\text{C}$; a následně $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do $270\text{ }^{\circ}\text{C}$, konstantní po 4 min
- celková doba analýzy: 20,38 min

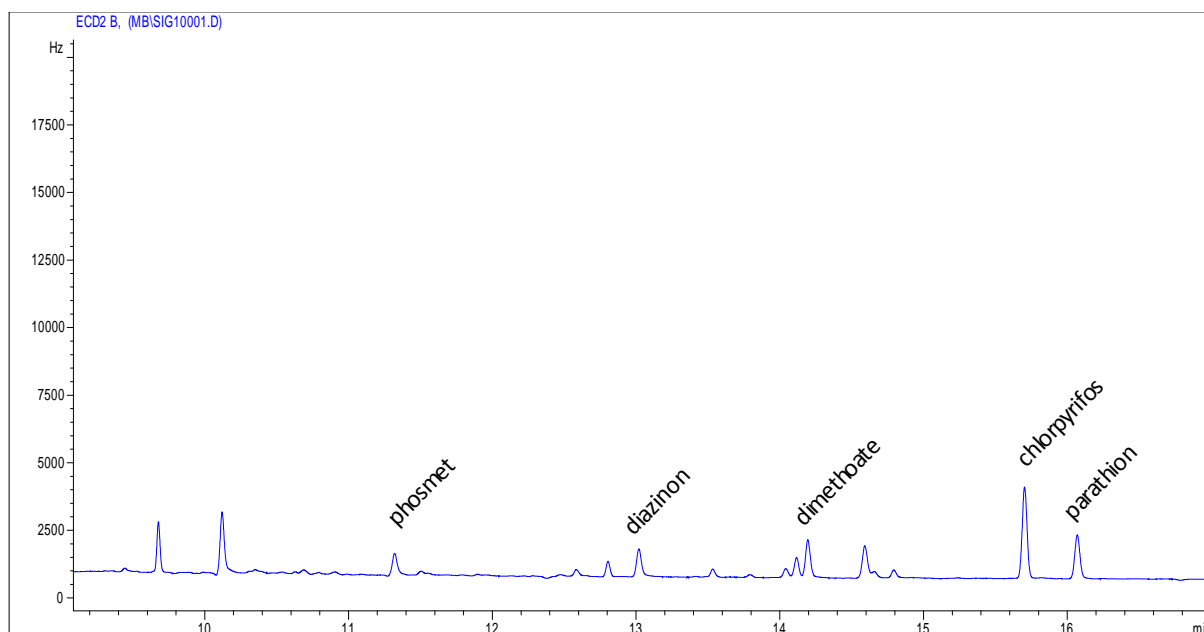


Obr. č. 12: Chromatogram směsi standardů o koncentraci $1\,000\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, (GC/MS)

Na přístroji Agilent 6890N s detektorem elektronového záchytu byly testovány dva druhy kolon: HT-8 a DB-17 MS. Pro vyhodnocování byl použit chromatogram získaný měřením na koloně DB-17 MS (chromatogramy z ECD2), kde bylo dosaženo vyšší odezvy u jednotlivých sledovaných analytů. Kolona HT-8 sloužila pro porovnání a potvrzení, že daná látka byla identifikována ve vzorku. Za podmínek nastavených na přístroji GC/ECD poskytovaly odezvy pouze vybrané pesticidy ze skupiny organofosfátů. Nebyly zde optimalizovány jiné podmínky, protože ke konečné analýze byl použit GC-TOF-MS a GC/ECD sloužil jen ke konfirmačnímu porovnání.



Obr. č. 13: Chromatogram směsi standardů o koncentraci $1\,000\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, (GC/ECD, kolona HT-8)

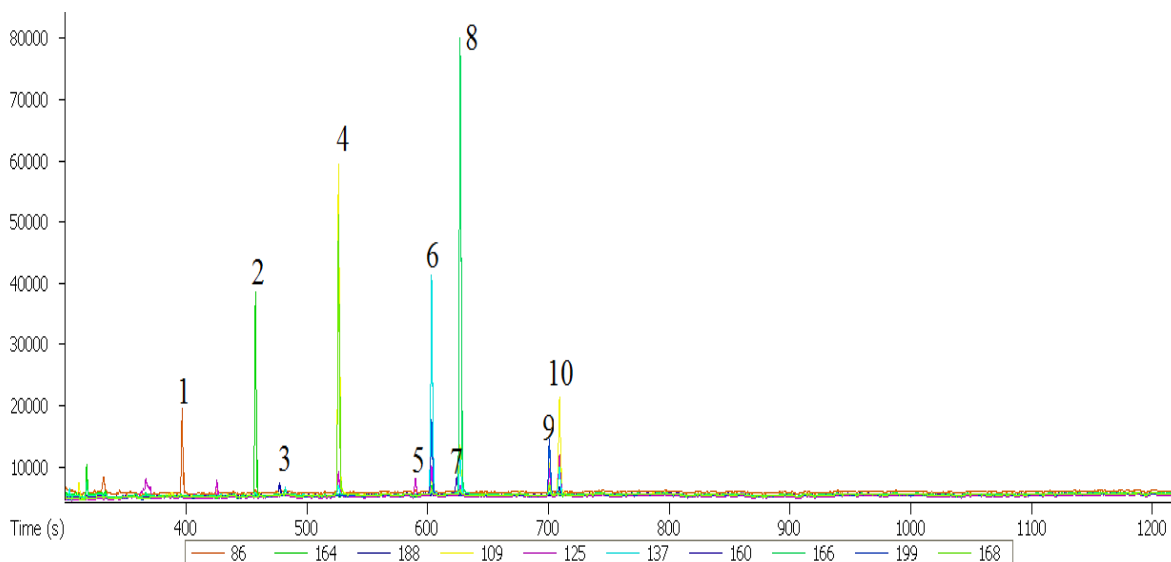


Obr. č. 14: Chromatogram směsi standardů o koncentraci $1\,000\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, (GC/ECD, kolona DB-17 MS)

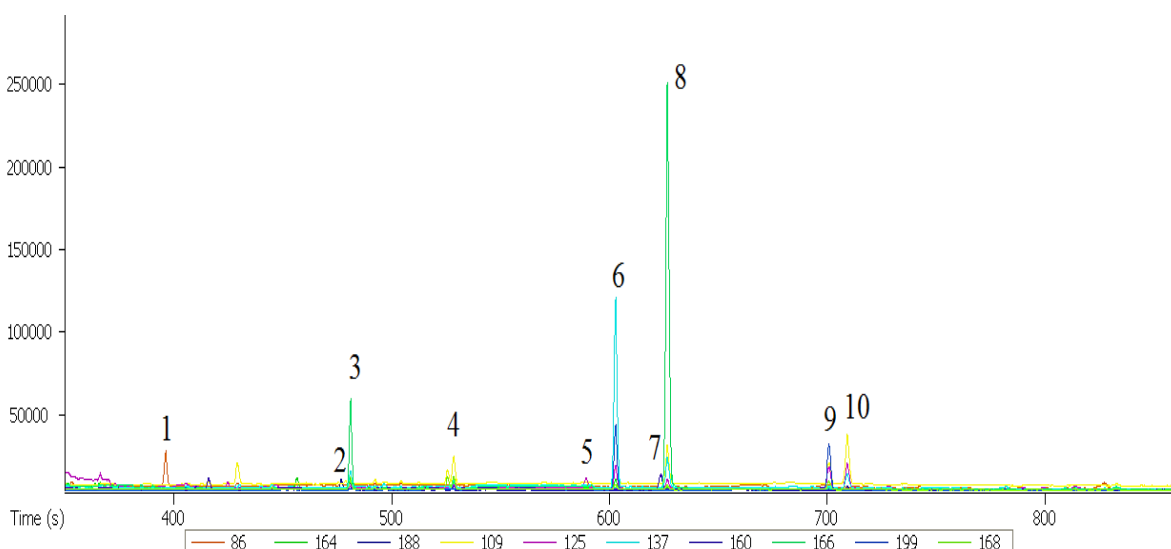
4.1.1 Optimalizace podmínek analýzy na přístroji Pegasus IV D

Optimalizace je prezentována pomocí následujících fragmentogramů. Byl zkrácen čas analýzy a bylo vyzkoušeno převedení vzorku do isooktanu. Směs standardů o koncentraci $1\,000\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla odpařena pomocí dusíku a následně opět rozpuštěna v 1 ml isooktanu.

Na základě zhodnocení uvedených fragmentogramů byl pro analýzu vybrán kratší čas analýzy a jako rozpouštědlo byl ponechán aceton.



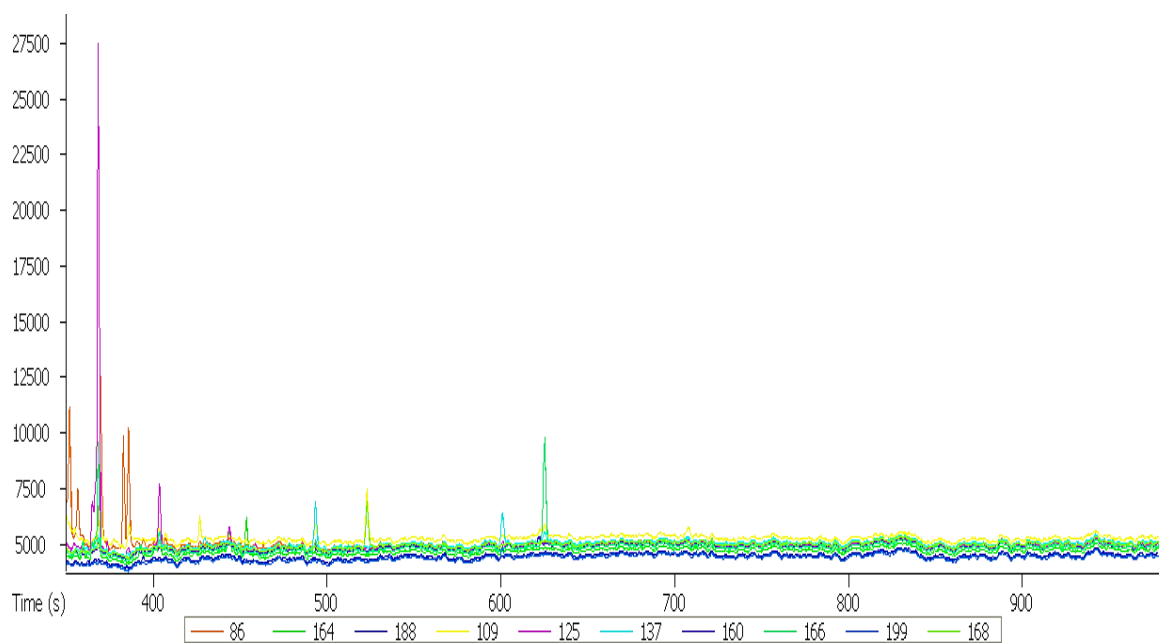
Obr. č. 15: Fragmentogram směsi standardů o koncentraci $1\,000\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ (delší čas analýzy)⁴



Obr. č. 16: Fragmentogram směsi standardů o koncentraci $1\,000\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ (zkrácený čas analýzy)⁵

⁴ 1-aldicarb, 2-carbofuran, 3-propamocarb, 4-methiocarb, 5-dimethoate, 6-diazinon, 7-phosmet, 8-pirimicarb, 9-chlorpyrifos, 10-parathion

⁵ 1-aldicarb, 2-propamocarb, 3-carbofuran, 4-methiocarb, 5-dimethoate, 6-diazinon, 7-phosmet, 8-pirimicarb, 9-chlorpyrifos, 10-parathion



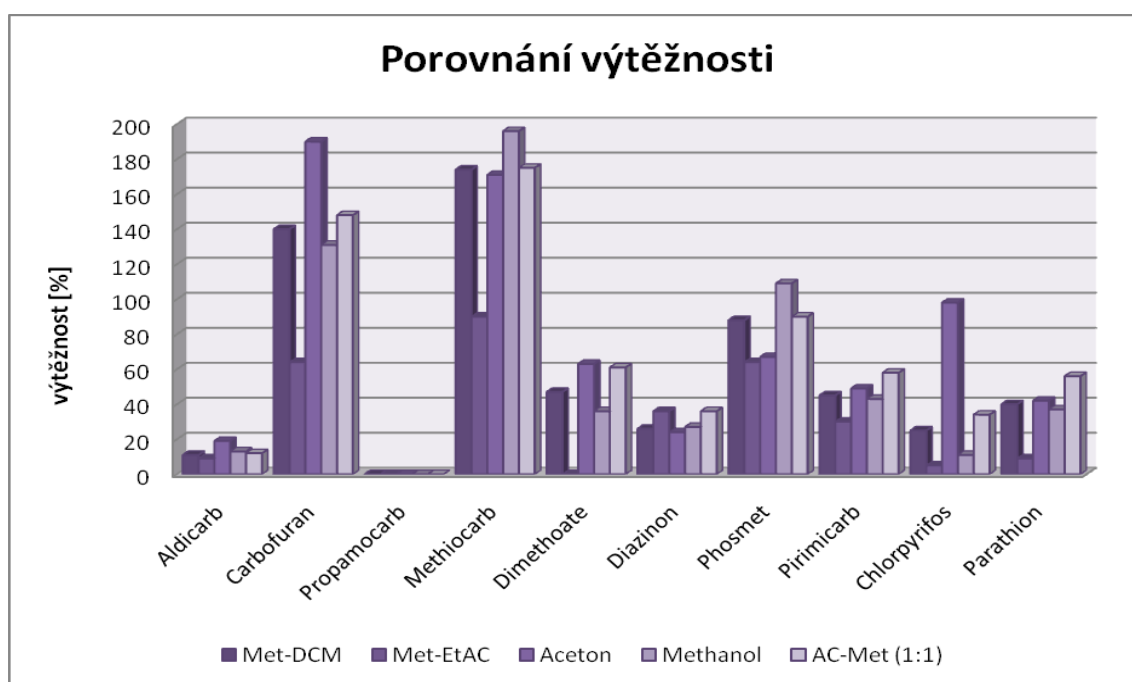
Obr. č. 17: Fragmentogram směsi standardů o koncentraci $1\,000\,\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ (převedení do isooktanu)

4.2 Optimalizace SPE pro extrakci vybraných pesticidů

Výtěžnost metody byla zjišťována pro dva typy sorbentů v kombinaci s několika elučními činidly. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce č. 12 a 13, grafické znázornění potom v Grafu č. 2 a 3.

Tabulka č. 12: Hodnoty výtěžnosti pro kolonku ENVI-18

pesticidy	Met-DCM	Met-EtAC	aceton	methanol	AC-Met (1:1)
výtěžnost [%]					
aldicarb	11	9	19	13	12
carbofuran	140	64	190	131	148
propamocarb	0	0	0	0	0
methiocarb	174	90	171	196	175
dimethoate	47	0	63	36	61
diazinon	26	36	24	27	36
phosmet	88	64	67	109	90
pirimicarb	45	30	49	43	58
chlorpyrifos	25	5	98	11	34
parathion	40	9	42	37	56



Graf č. 2: Porovnání výtěžností při použití kolonek ENVI-18 a pěti různých elučních směsí

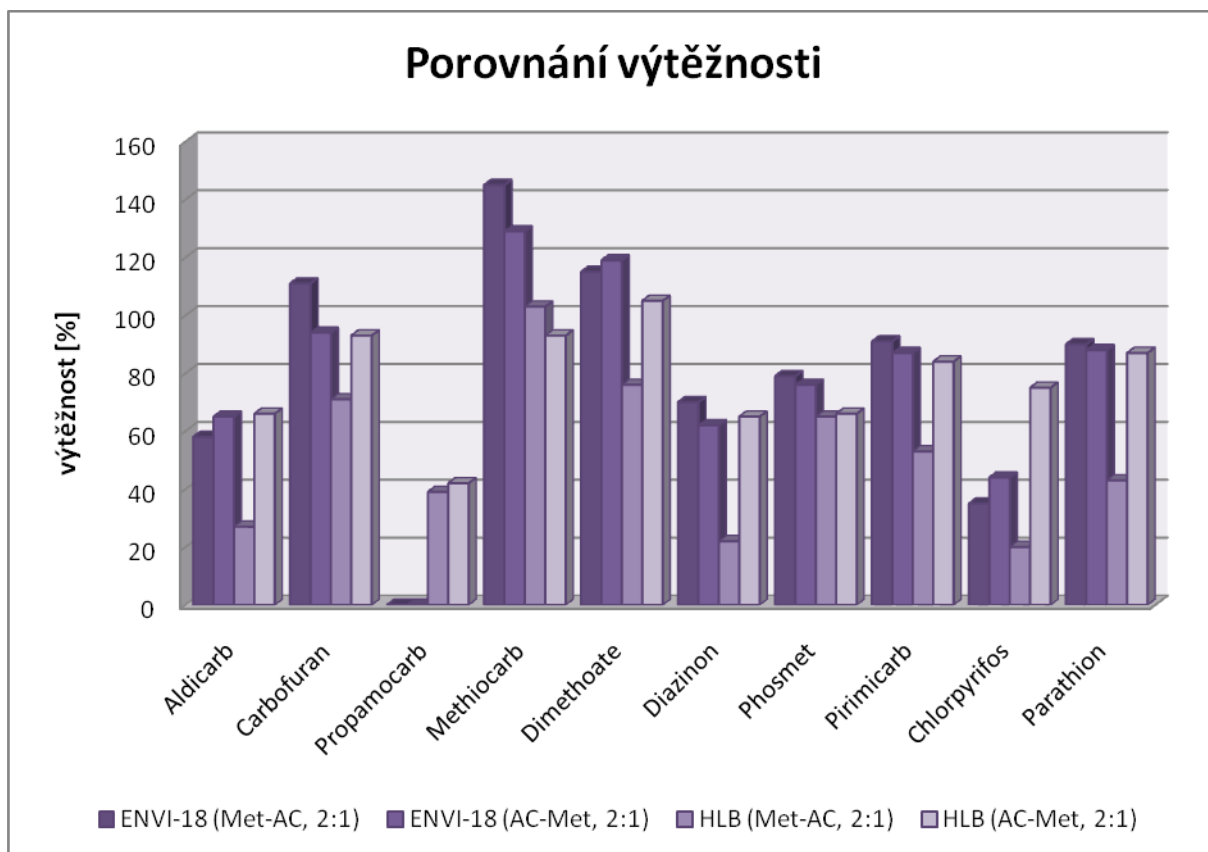
Nejlepší hodnoty výtěžnosti byly získány se směsí aceton-methanol; stále však byly některé hodnoty nízké, a proto byl dále optimalizován vhodný poměr směsi aceton-methanol a také byl vyzkoušen jiný typ kolonky (Oasis HLB) - uvedeno v Tabulce č. 13. Naopak nejnižší hodnoty byly zjištěny u směsi methanol-ethylacetát, u ostatních elučních činidel byly výsledky srovnatelné.

Tabulka č. 13: Hodnoty výtěžnosti pro kolonky ENVI-18 a HLB v kombinaci s eluční směsí aceton-methanol (2:1 a 1:2)

pesticidy	ENVI-18		Oasis HLB	
	Met-AC (2:1)	AC-Met (2:1)	Met-AC (2:1)	AC-Met (2:1)
výtěžnost [%]				
aldicarb	58	65	27	66
carbofuran	111	94	71	93
propamocarb	0	0	39	42
methiocarb	145	129	103	93
dimethoate	115	119	76	105
diazinon	70	62	22	65
phosmet	79	76	65	66
pirimicarb	91	87	53	84
chlorpyrifos	35	44	20	75
parathion	90	88	43	87

Při aplikaci kolonek Oasis HLB byly získány lepší hodnoty výtěžnosti pro polárnější látky než při použití kolonek ENVI-18. Důvodem pro toto posouzení bylo i to, že se v případě použití kolonky Oasis HLB podařilo vyextrahovat i sloučeninu propamocarb. Tyto kolonky byly následně použity pro extrakci reálných vzorků.

Hodnoty výtěžnosti identifikovaných analytů při použití eluční směsi methanol-aceton (2:1) se často pohybovaly pod 50 %. Z toho důvodu byla pro získání vybraných pesticidů z reálných vzorků vybrána eluční směs aceton-methanol (2:1).



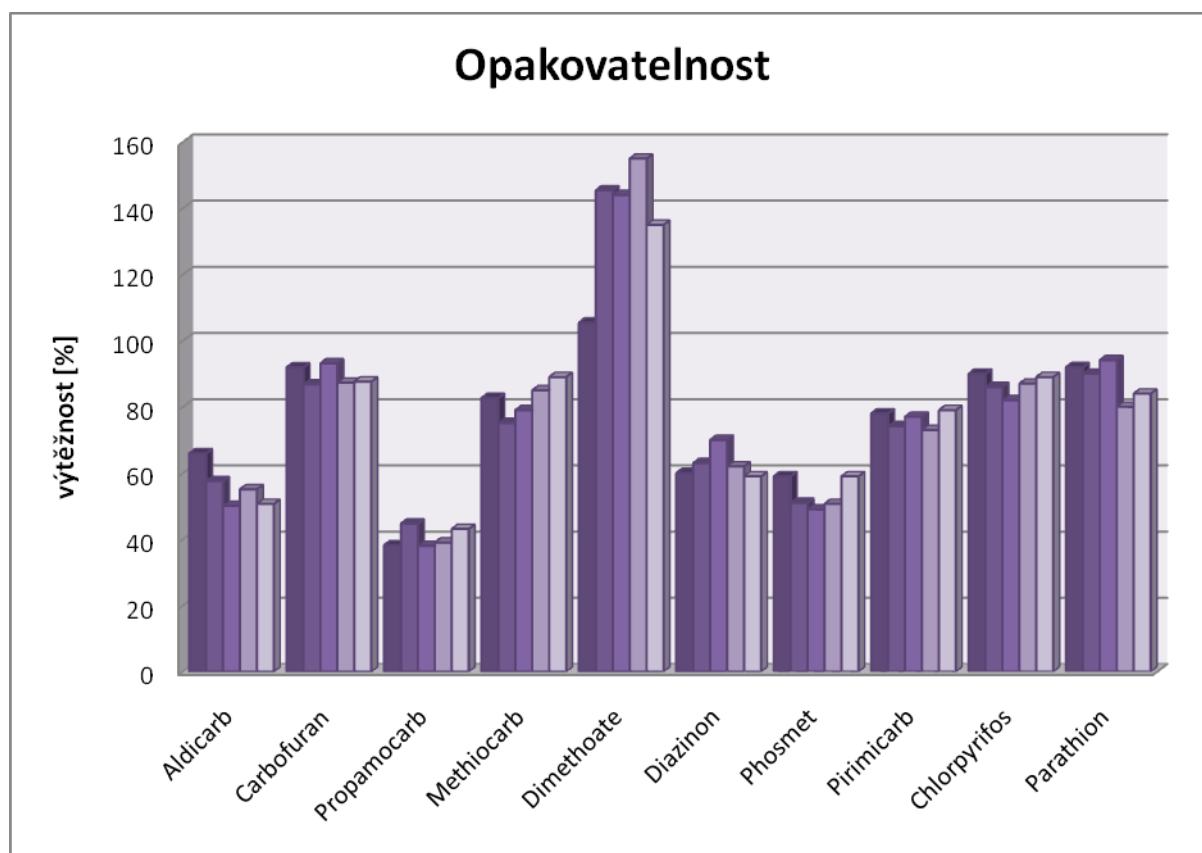
Graf č. 3: Porovnání výtěžností při použití dvou typů kolon a dvou elučních činidel

4.2.1 Ověření výtěžnosti vybrané SPE metody pro reálné vzorky

Před použitím při analýze reálných vzorků byla optimalizovaná metoda SPE ověřena pomocí většího počtu pokusů a byla určena relativní směrodatná odchylka. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce č. 14 a v Grafu č. 4.

Tabulka č. 14: Hodnoty výtěžnosti pro jednotlivé pesticidy, $n = 5$

pesticidy	prům. výtěžnost [%]	RSD [%]
aldicarb	56	11,5
carbofuran	89	3,2
propamocarb	41	7,9
methiocarb	82	6,5
dimethoate	136	13,8
diazinon	63	6,8
phosmet	54	8,9
pirimicarb	76	3,4
chlorpyrifos	86	3,6
parathion	88	6,6



Graf č. 4: Grafické porovnání hodnot výtěžnosti při opakovaných pokusech pomocí optimalizované SPE

4.3 Kalibrace, limity detekce a kvantifikace

Pro určení koncentrace pesticidů v reálných vzorcích vod byly sestaveny kalibrační křivky. Připravené kalibrační roztoky byly proměřeny optimalizovanou metodou a do grafů byly vyneseny lineární závislosti plochy píků na koncentraci. Hodnoty směrnice, úseku a korelačního koeficientu jsou uvedeny v Tabulce č. 15 a 16.

Limity detekce a kvantifikace byly vypočítány podle uvedeného vzorce:

$$LOD = \frac{3 \cdot h_s}{m}$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot h_s}{m}$$

h_s výška šumu

msměrnice kalibrační křivky [$f(c) = h$, závislost výšky píku na koncentraci]

Mez detekce odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Vyjadřuje se jako trojnásobek šumu základní linie. Mez stanovitelnosti odpovídá koncentraci, při které je hodnota signálu stanovení taková, že dovoluje kvantitativní vyhodnocení a vyjadřuje se jako desetinásobek šumu základní linie.

Získané hodnoty LOD a LOQ byly přepočítány na konečné koncentrace pesticidů v reálných vzorcích vody, uvedeno v $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$. Hodnoty limitů detekce a kvantifikace jsou uvedeny v Tabulce č. 17 a 18.

Tabulka č. 15: Hodnoty směrnice, úseku a koeficientu determinace pro jednotlivé pesticidy stanovované pomocí GC/MS-TOF

pesticidy	směrnice	úsek	koeficient determinace
aldicarb	163	-617	0,996
carbofuran	1536	-7479	0,997
propamocarb	147	-404	0,996
methiocarb	1370	205586	0,998
dimethoate	90	-2491	0,999
diazinon	1678	-20141	0,998
phosmet	55	-232	0,999
pirimicarb	3811	-23840	0,994
chlorpyrifos	616	6181	0,992
parathion	814	-6424	0,997

Tabulka č. 16: Hodnoty směrnice, úseku a koeficientu determinace pro jednotlivé pesticidy stanovované pomocí GC/ECD

pesticidy	směrnice	úsek	koeficient determinace
phosmet	27,375	-861,7	0,999
diazinon	15,67	-312,71	0,995
dimethoate	84,878	-4594,1	0,992
chlorpyrifos	161,11	-5531,7	0,998
parathion	83,118	-2641,6	0,993

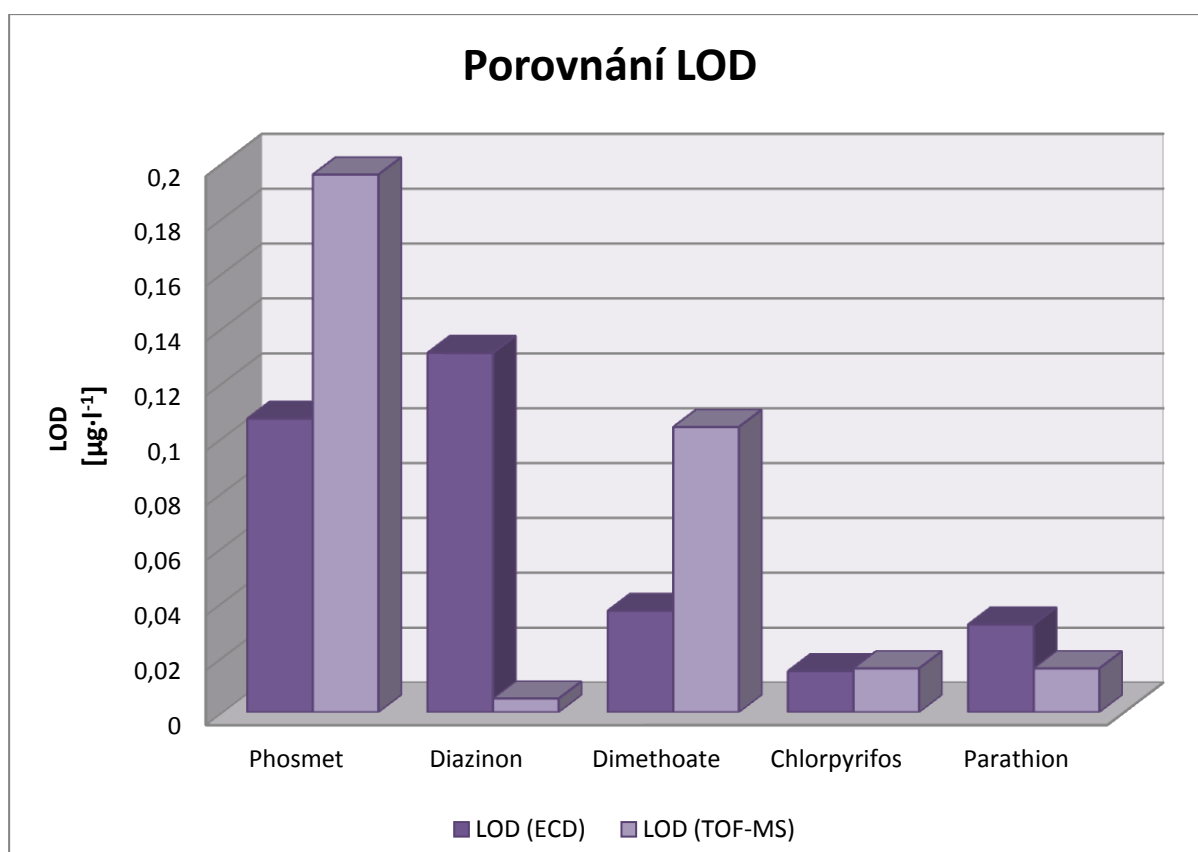
Tabulka č. 17: Hodnoty limitů detekce (LOD) a limitů kvantifikace (LOQ) pro jednotlivé pesticidy stanovované metodou GC/MS-TOF

pesticidy	linearita	LOD [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	LOQ [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]
aldicarb	0,997	0,051	0,168
carbofuran	0,998	0,055	0,187
propamocarb	0,989	0,038	0,125
methiocarb	0,991	0,006	0,022
dimethoate	0,996	0,104	0,348
diazinon	0,992	0,005	0,016
phosmet	0,994	0,196	0,651
pirimicarb	0,998	0,002	0,007
chlorpyrifos	0,979	0,016	0,053
parathion	0,997	0,016	0,054

Tabulka č. 18: Hodnoty limitů detekce (LOD) a limitů kvantifikace (LOQ) pro jednotlivé pesticidy stanovené metodou GC/ECD

pesticidy	linearita	LOD [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	LOQ [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]
phosmet	0,992	0,107	0,356
diazinon	0,998	0,131	0,437
dimethoate	0,995	0,037	0,124
chlorpyrifos	0,998	0,015	0,050
parathion	0,994	0,032	0,106

Z hlediska porovnání limitů detekce organofosfátů u obou použitých přístrojů nelze jednoznačně říci, který ze systémů je vhodnější. Shodné LOD vykazuje sloučenina chlorpyrifos, u parathionu a diazinonu je LOD nižší, pokud použijeme systém GC/MS-TOF, naopak u phosmetu a dimethoatu je LOD nižší, pokud použijeme systém GC/ECD.



Graf č. 5: Grafické porovnání limitů detekce u organofosfátů

4.4 Výsledky stanovení pesticidů ve vzorcích odpadní vody

Vzorky odpadní vody byly odebírány po dobu 14 dní, a to na přítoku i na odtoku na ČOV v Brně-Modřicích. Výsledky analýzy jsou uvedeny v následujících tabulkách a grafech. V tabulkách je vždy uvedeno datum odběru na přítoku a k němu odpovídající datum odtoku z ČOV. Čištění na ČOV v Brně-Modřicích probíhá tak, že než přitékající voda projde celým procesem čištění, trvá to zhruba 24 hodin; z toho vyplývá, že poslední den odběru – 1. 5. 2012 nemá odpovídající odtok.

Z Tabulky č. 19, 20 a 21 je patrné, že během čistících procesů dochází k částečnému odstranění následujících sloučenin: carbofuran, diazinon, chlorpyrifos, parathion, phosmet a dimethoate. Největší účinnost odstranění byla prokázána u chlorpyrifosu, kdy dochází k průměrnému úbytku této sloučeniny o 70 %. Nejmenší je pak u carbofuranu, kde bylo odstranění pouze 17 %. Naopak u methiocarbu a pirimicarbu jsou na odtoku zaznamenány vyšší koncentrace než na přítoku. To může být způsobeno kumulováním těchto látek v aktivovaném kalu a jejich následným vyplavováním v průběhu procesů čištění. U methiocarbu dochází k průměrnému zvýšení koncentrace o 22 %, u pirimicarbu o 37 %. Sloučeniny aldicarb a propamocarb nebyly většinou vůbec detekovány, případně se nacházely v nepatrných koncentracích, často pod mezí detekce nebo kvantifikace.

Tabulka č. 19: Výsledné koncentrace sledovaných pesticidů stanovené pomocí GC/MS-TOF, (vzorky odebírány 18.4.12 – 24.4.12)

pesticidy		c [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]						
		18.4.	19.4.	20.4.	21.4.	22.4.	23.4.	24.4.
aldicarb	Přítok	< LOQ	< LOQ	nd	nd	nd	nd	nd
	Odtok	< LOQ	< LOQ	nd	nd	nd	nd	nd
carbofuran	Přítok	< LOQ	0,39±0,02	< LOQ	0,38±0,08	0,21±0,16	0,58±0,01	0,28±0,10
	Odtok	0,43±0,04	0,32±0,08	< LOQ	0,24±0,07	0,20±0,05	< LOQ	0,26±0,09
propamocarb	Přítok	nd	nd	nd	< LOD	nd	0,20±0,05	< LOD
	Odtok	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
methiocarb	Přítok	< LOD	2,25±0,94	< LOD	1,36±0,99	2,25±0,95	3,50±1,28	3,65±0,92
	Odtok	3,11±0,86	3,22±1,07	< LOD	1,89±0,63	2,76±0,72	< LOD	4,30±0,85
dimethoate	Přítok	nd	nd	nd	< LOQ	nd	nd	< LOQ
	Odtok	< LOQ	nd	nd	nd	nd	nd	< LOQ
diazinon	Přítok	0,14±0,02	0,14±0,03	0,95±0,09	0,87±0,07	0,43±0,09	0,61±0,08	1,39±0,57
	Odtok	0,74±0,01	0,12±0,08	0,90±0,08	0,54±0,06	0,84±0,38	0,11±0,04	0,34±0,20
phosmet	Přítok	< LOD	< LOD	nd	nd	nd	< LOD	< LOD
	Odtok	< LOD	nd	nd	nd	nd	< LOD	< LOD
pirimicarb	Přítok	0,09±0,01	0,04±0,006	0,07±0,03	0,56±0,08	0,28±0,08	0,42±0,26	0,25±0,03
	Odtok	0,46±0,07	0,39±0,02	0,24±0,13	0,76±0,03	0,33±0,06	0,05±0,07	0,31±0,07
chlorpyrifos	Přítok	0,59±0,03	0,63±0,07	0,44±0,03	0,79±0,04	0,47±0,03	0,71±0,04	0,68±0,05
	Odtok	0,09±0,09	0,33±0,03	0,05±0,08	0,18±0,09	0,09±0,04	0,07±0,09	0,10±0,02
parathion	Přítok	0,36±0,06	0,38±0,04	0,42±0,18	< LOQ	0,55±0,05	1,20±0,40	0,76±0,07
	Odtok	0,30±0,02	0,28±0,07	0,30±0,08	< LOQ	0,26±0,09	< LOQ	0,33±0,03

Pozn: < LOD – koncentrace menší než limit detekce, < LOQ – koncentrace menší než limit kvantifikace, nd – nedetekováno

Tabulka č. 20: Výsledné koncentrace sledovaných pesticidů stanovené pomocí GC/MS-TOF, (vzorky odebírány 25.4.12 – 1.5.12)

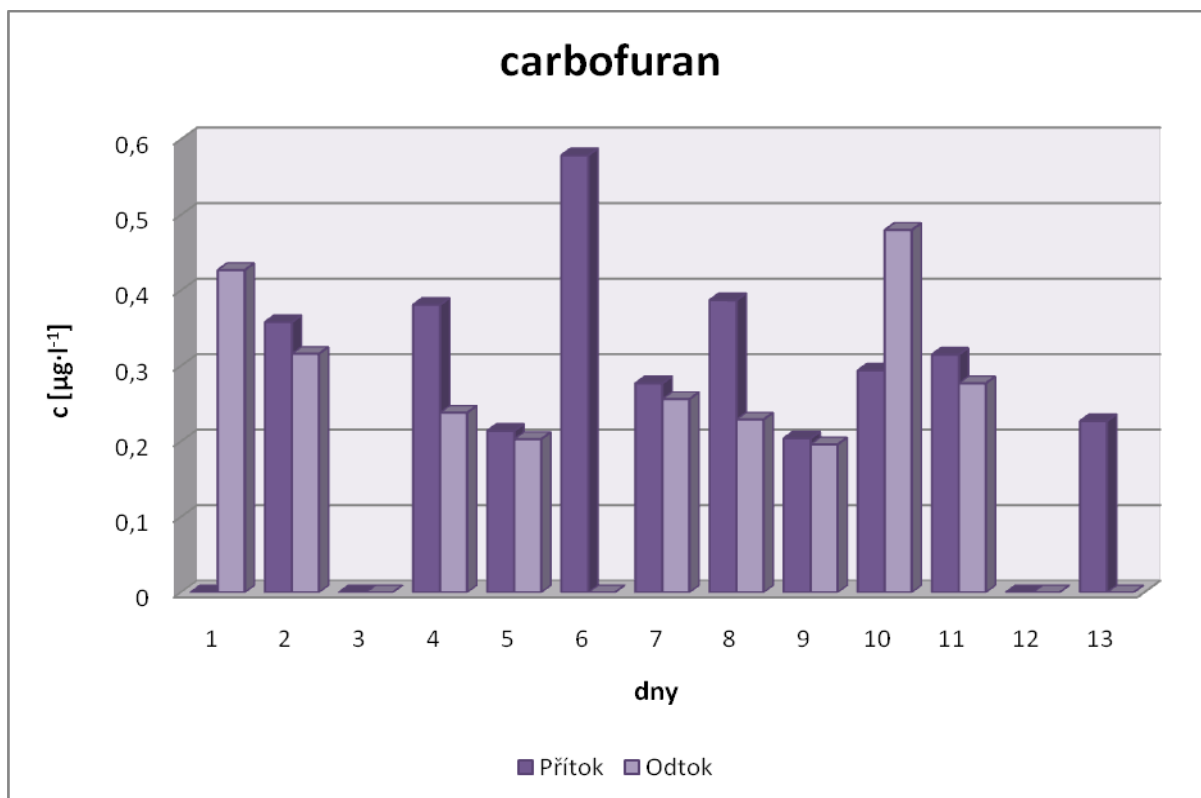
pesticidy		c [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]						
		25.4.	26.4.	27.4.	28.4.	29.4.	30.4.	1.5.
aldicarb	Přítok	nd	< LOQ	nd	nd	nd	nd	nd
	Odtok	nd	< LOQ	nd	nd	nd	nd	
carbofuran	Přítok	0,39±0,06	0,20±0,06	0,29±0,02	0,32±0,08	< LOQ	0,23±0,004	0,25±0,09
	Odtok	0,23±0,02	0,19±0,13	0,48±0,07	0,28±0,03	< LOD	< LOQ	
propamocarb	Přítok	nd	nd	< LOQ	< LOQ	nd	nd	nd
	Odtok	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
methiocarb	Přítok	4,31±1,02	1,37±0,81	3,99±0,21	2,75±0,89	1,55±0,99	3,01±0,84	< LOD
	Odtok	4,26±0,82	< LOD	3,43±0,31	2,85±0,61	2,38±0,53	2,03±1,07	
dimethoate	Přítok	nd	nd	1,72±0,87	nd	nd	< LOQ	nd
	Odtok	nd	nd	0,86±0,16	nd	nd	< LOD	
diazinon	Přítok	0,91±0,02	0,44±0,05	0,99±0,08	0,97±0,05	1,02±0,12	0,76±0,03	0,54±0,08
	Odtok	0,89±0,05	0,11±0,47	0,84±0,06	0,91±0,03	0,65±0,06	0,75±0,07	
phosmet	Přítok	nd	nd	nd	nd	< LOD	nd	nd
	Odtok	nd	nd	nd	nd	< LOD	nd	
pirimicarb	Přítok	0,36±0,06	0,23±0,03	0,38±0,03	0,28±0,07	0,42±0,03	0,37±0,05	0,56±0,09
	Odtok	0,04±0,02	0,24±0,04	0,59±0,05	0,43±0,14	0,54±0,01	0,38±0,04	
chlorpyrifos	Přítok	0,31±0,02	0,53±0,08	0,66±0,04	0,63±0,06	0,53±0,007	0,75±0,02	0,68±0,05
	Odtok	0,07±0,04	0,07±0,04	0,08±0,05	0,09±0,03	0,09±0,04	0,11±0,06	
parathion	Přítok	0,32±0,07	0,59±0,08	0,98±0,04	0,46±0,07	0,67±0,03	0,47±0,09	0,33±0,09
	Odtok	0,28±0,02	0,27±0,10	0,69±0,09	0,38±0,03	0,26±0,04	0,40±0,08	

Pozn: < LOD – koncentrace menší než limit detekce, < LOQ – koncentrace menší než limit kvantifikace, nd – nedetekováno

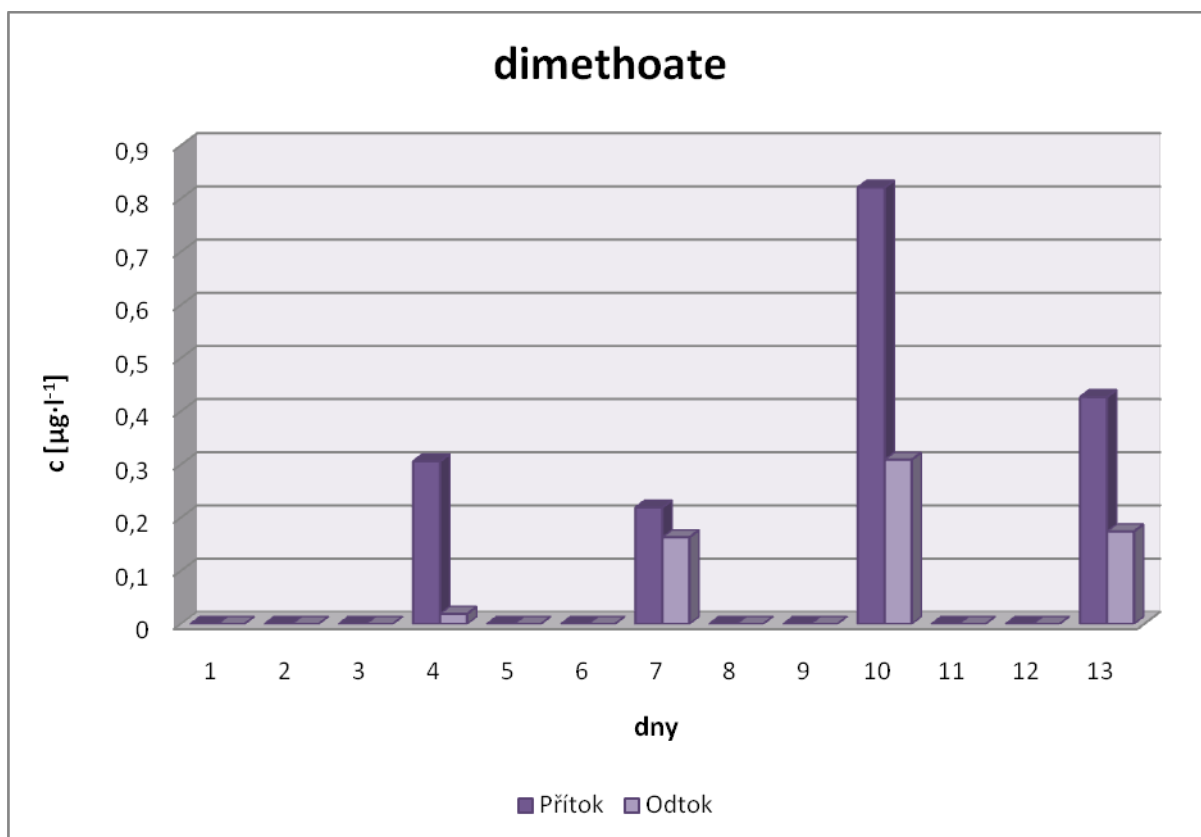
Tabulka č. 21: Výsledné koncentrace sledovaných pesticidů stanovené pomocí GC/ECD, (vzorky odebrány 18. 4. 12 – 1. 5. 12)

pesticidy		c [µg·l ⁻¹]						
		18.4.	19.4.	20.4.	21.4.	22.4.	23.4.	24.4.
phosmet	Přítok	0,58±0,02	0,69±0,06	nd	nd	nd	0,53±0,03	0,72±0,08
	Odtok	< LOQ	0,42±0,03	nd	nd	nd	0,39±0,05	0,47±0,03
diazinon	Přítok	< LOQ	< LOQ	0,76±0,08	0,72±0,31	0,50±0,04	0,67±0,22	1,01±0,03
	Odtok	0,59±0,02	< LOQ	0,46±0,07	0,43±0,04	0,49±0,07	< LOQ	< LOQ
dimethoate	Přítok	nd	nd	nd	0,31±0,04	nd	nd	0,21±0,03
	Odtok	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,16±0,07
chlorpyrifos	Přítok	0,56±0,08	0,24±0,28	0,19±0,008	0,24±0,09	0,17±0,19	0,17±0,06	0,19±0,06
	Odtok	0,10±0,03	0,12±0,07	0,09±0,05	0,11±0,02	0,09±0,09	0,07±0,04	0,06±0,08
parathion	Přítok	0,39±0,19	0,31±0,17	0,58±0,06	< LOQ	0,57±0,007	0,99±0,05	0,65±0,04
	Odtok	0,24±0,04	0,26±0,13	0,23±0,07	< LOQ	0,23±0,20	0,24±0,18	0,24±0,09
pesticidy		c [µg·l ⁻¹]						
		25.4.	26.4.	27.4.	28.4.	29.4.	30.4.	1.5.
phosmet	Přítok	nd	nd	nd	nd	0,68±0,07	nd	nd
	Odtok	nd	nd	nd	nd	0,40±0,09	nd	nd
diazinon	Přítok	0,86±0,08	0,41±0,11	0,96±0,07	0,88±0,007	0,99±0,19	0,64±0,15	0,43±0,27
	Odtok	< LOQ	< LOQ	0,79±0,02	0,81±0,04	0,55±0,08	0,63±0,07	
dimethoate	Přítok	nd	nd	0,82±0,17	nd	nd	0,43±0,06	nd
	Odtok	nd	nd	0,31±0,06	nd	nd	0,17±0,02	
chlorpyrifos	Přítok	0,18±0,07	0,21±0,09	0,39±0,05	0,44±0,02	0,19±0,04	0,21±0,01	0,17±0,008
	Odtok	0,08±0,05	0,12±0,007	0,11±0,08	0,13±0,07	0,08±0,05	0,08±0,06	
parathion	Přítok	0,38±0,06	0,39±0,03	0,94±0,01	0,48±0,06	0,61±0,05	0,39±0,08	0,33±0,01
	Odtok	0,26±0,08	0,19±0,05	0,48±0,06	0,31±0,02	0,23±0,08	0,22±0,06	

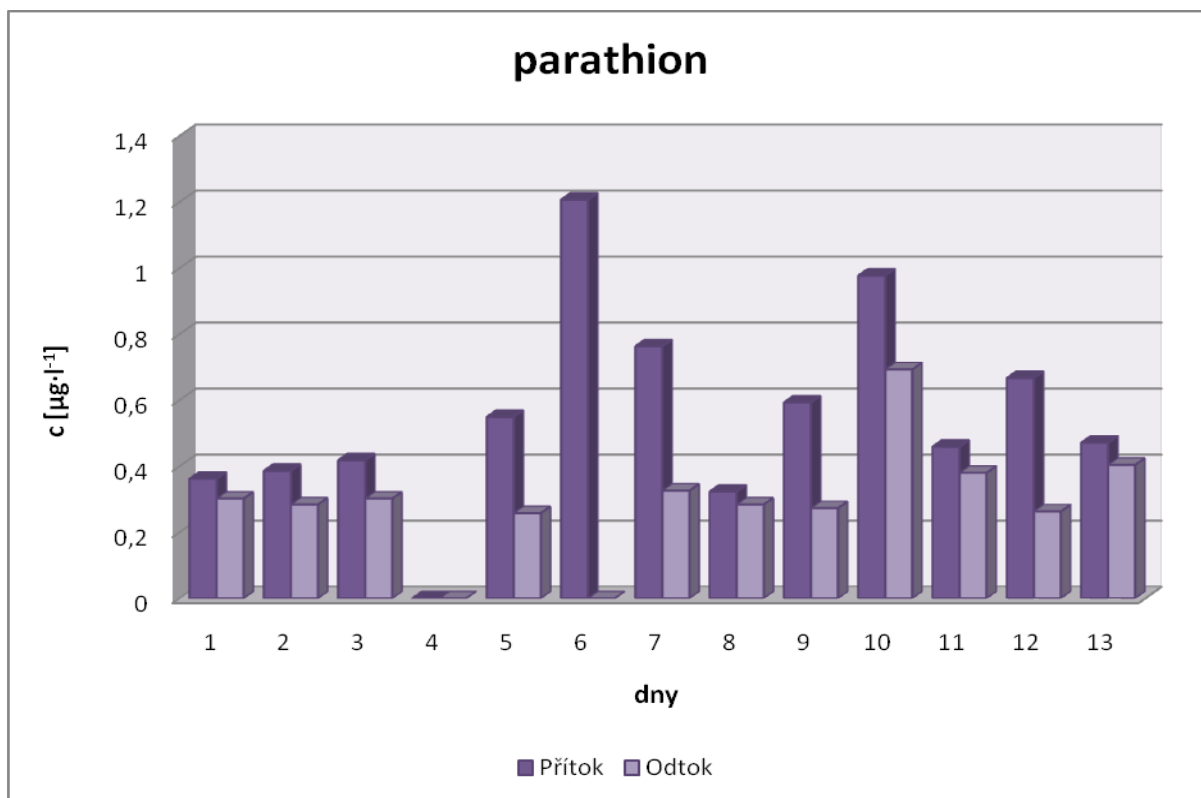
Pozn: < LOD – koncentrace menší než limit detekce, < LOQ – koncentrace menší než limit kvantifikace, nd – nedetekováno



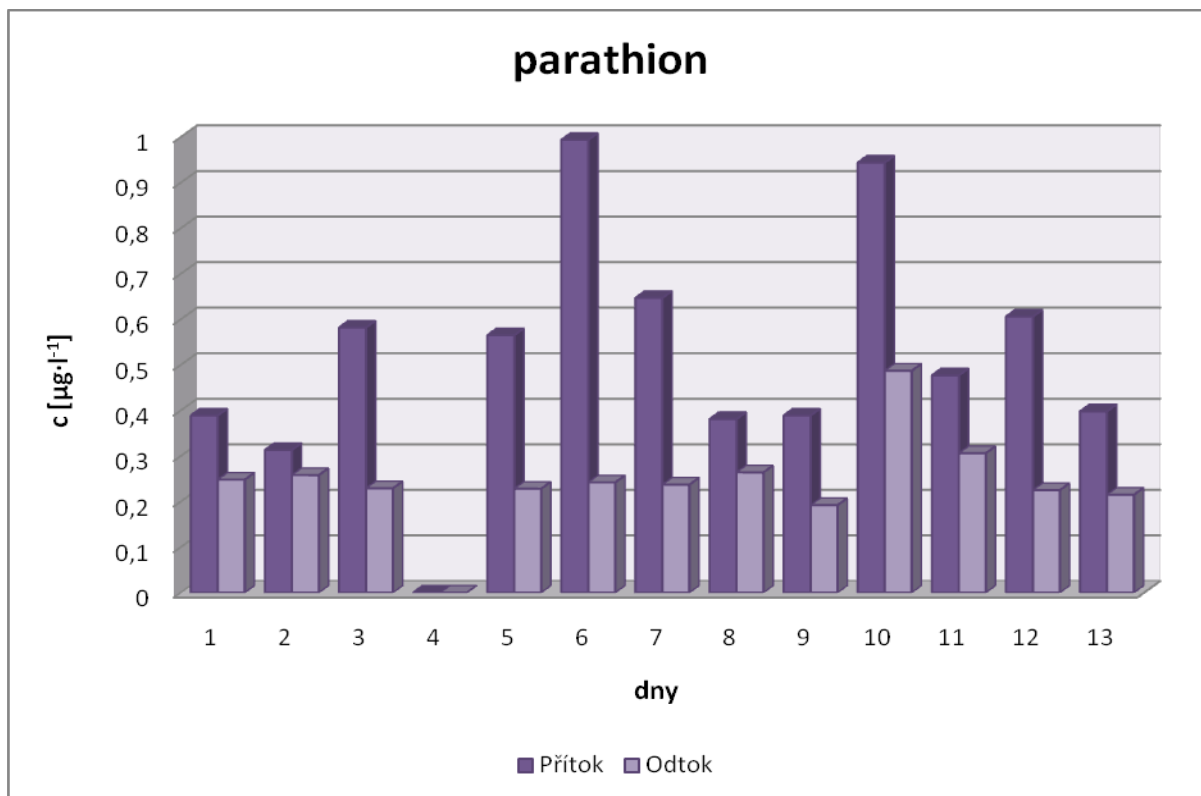
Graf č. 6: Změna koncentrace carbofuranu na přítoku a na odtoku; stanovované pomocí GC/MS-TOF



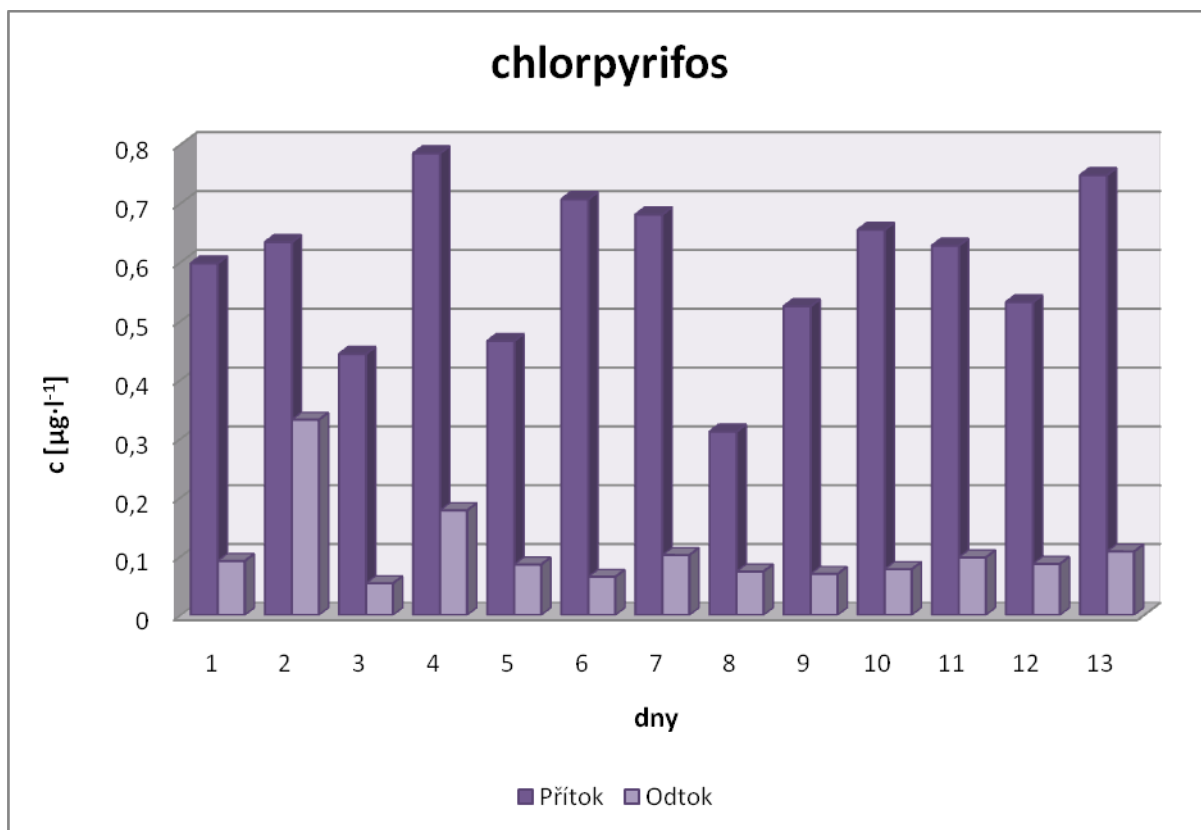
Graf č. 7: Změna koncentrace dimethoate na přítoku a odtoku; stanovované pomocí GC/ECD



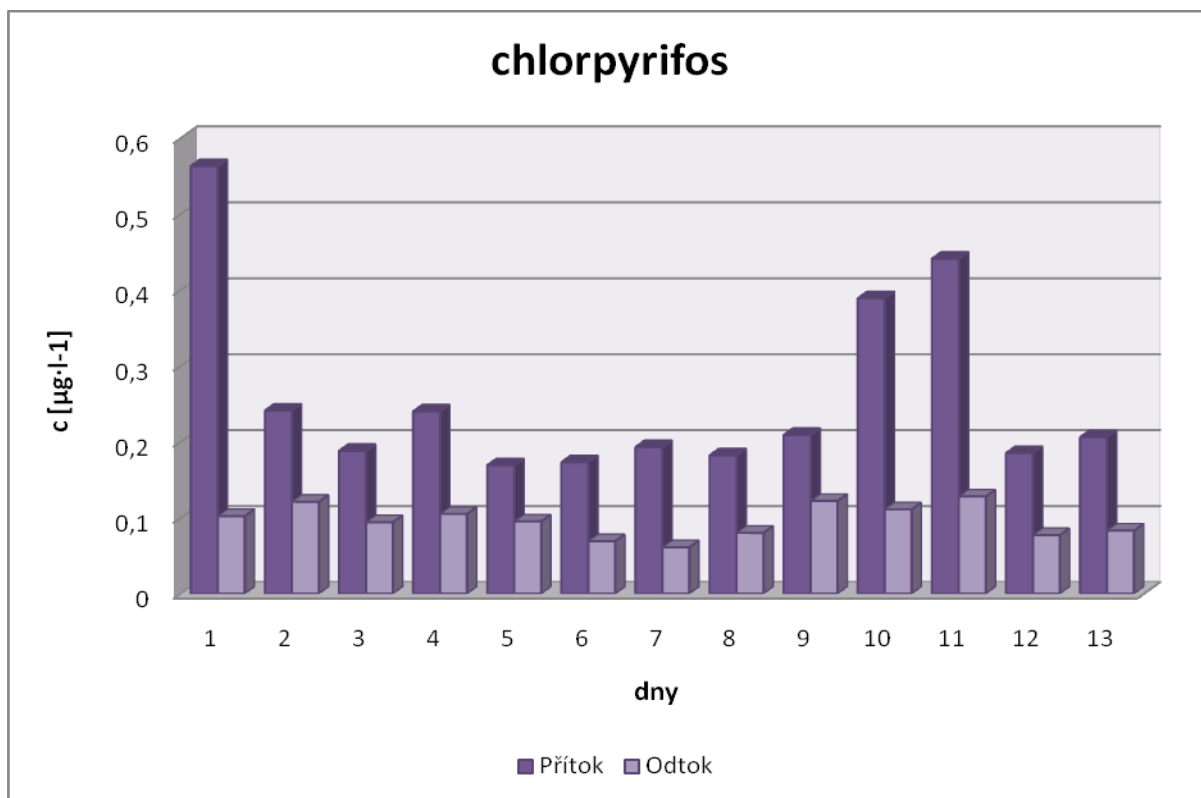
Graf č. 8: Změna koncentrace parathionu na přítoku a na odtoku; stanovované pomocí GC/MS-TOF



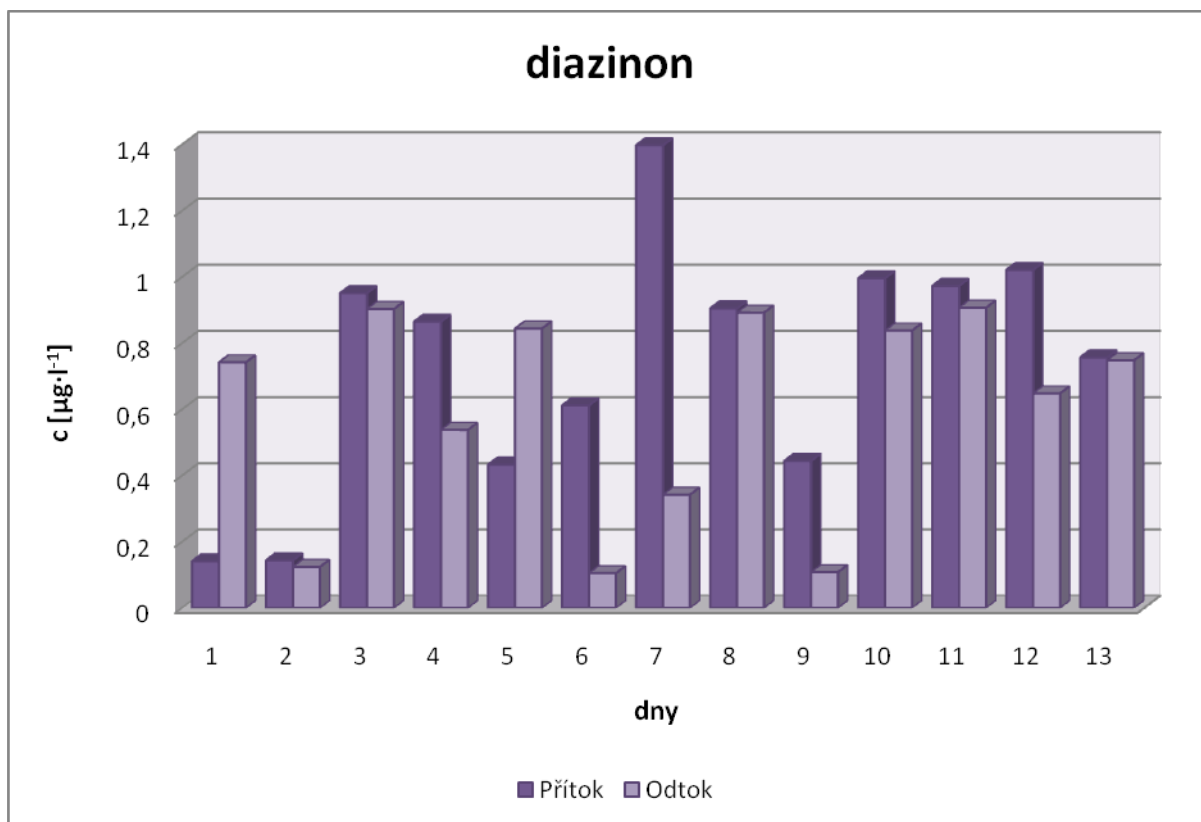
Graf č. 9: Změna koncentrace parathionu na přítoku a na odtoku; stanovované pomocí GC/ECD



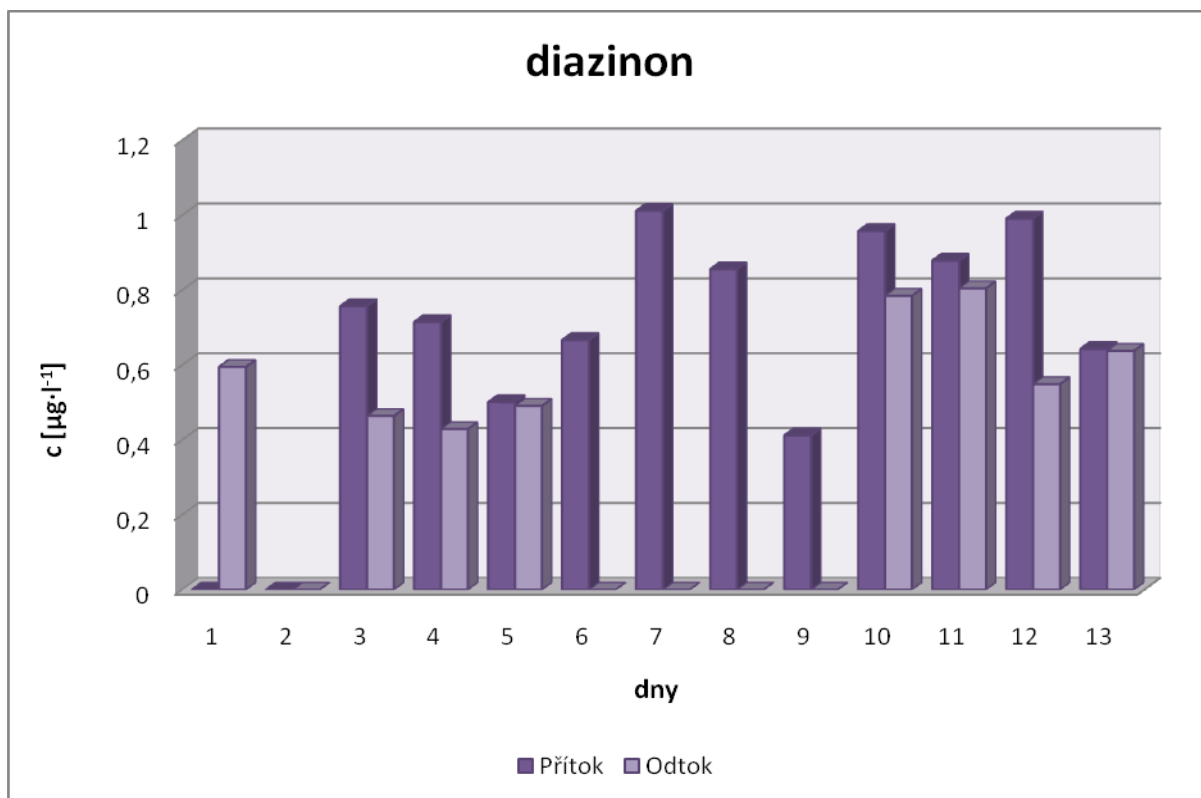
Graf č. 10: Změna koncentrace chlorpyrifosu na přítoku a na odtoku; stanovované pomocí GC/MS-TOF



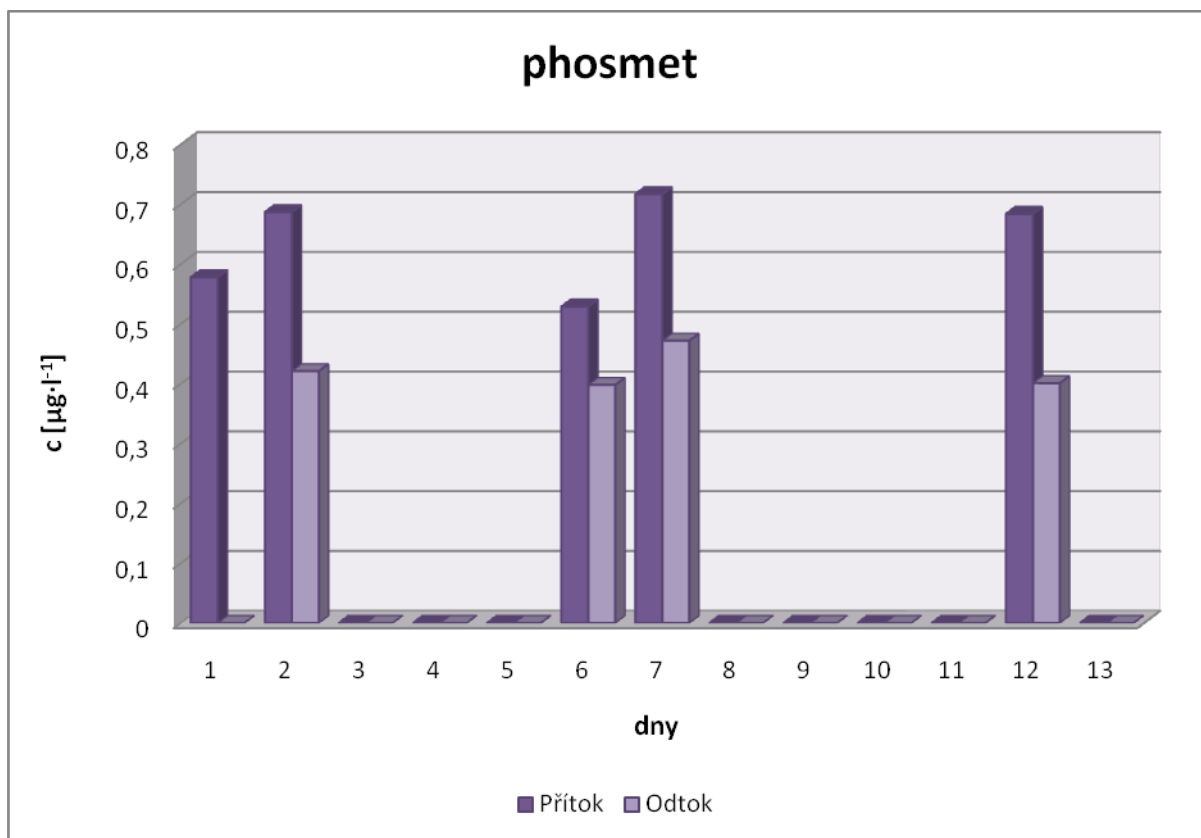
Graf č. 11: Změna koncentrace chlorpyrifosu na přítoku a na odtoku; stanovované pomocí GC/ECD



Graf č. 12: Změna koncentrace diazinonu v přítoku a odtoku; stanovované pomocí GC/MS-TOF



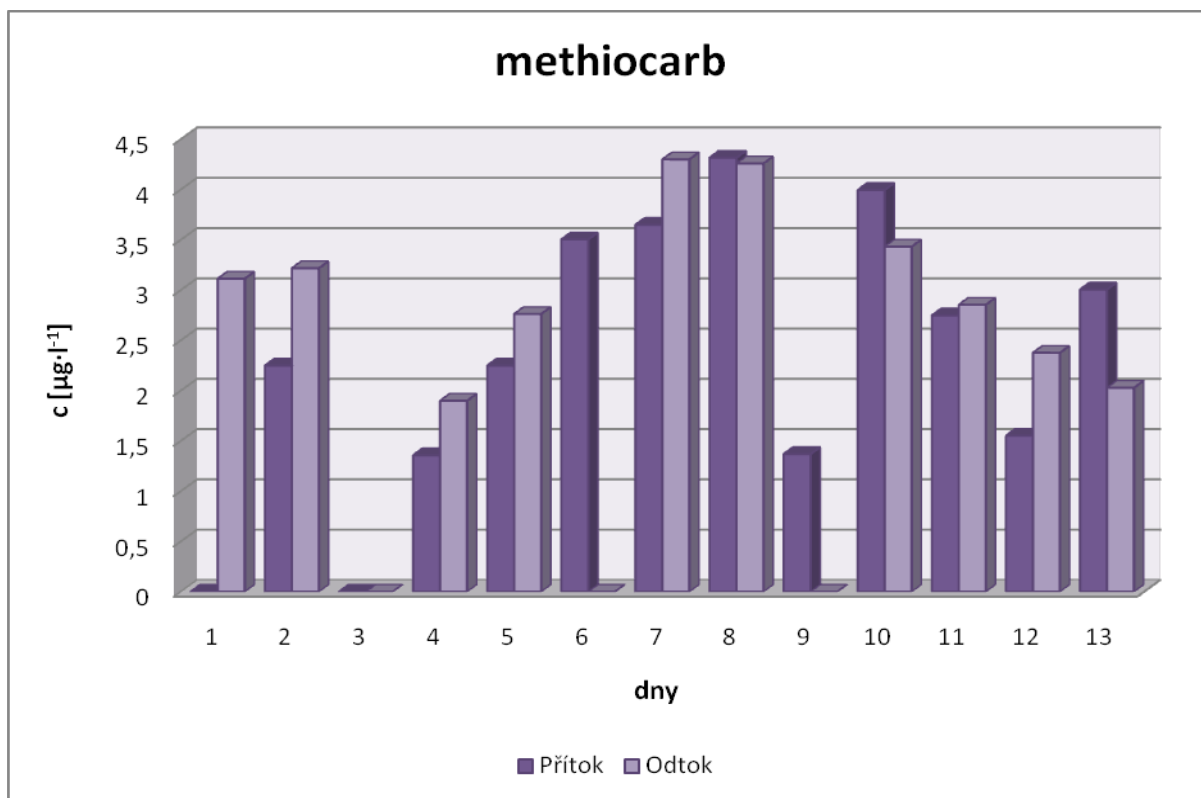
Graf č. 13: Změna koncentrace diazinonu na přítoku a na odtoku; stanovované pomocí GC/ECD



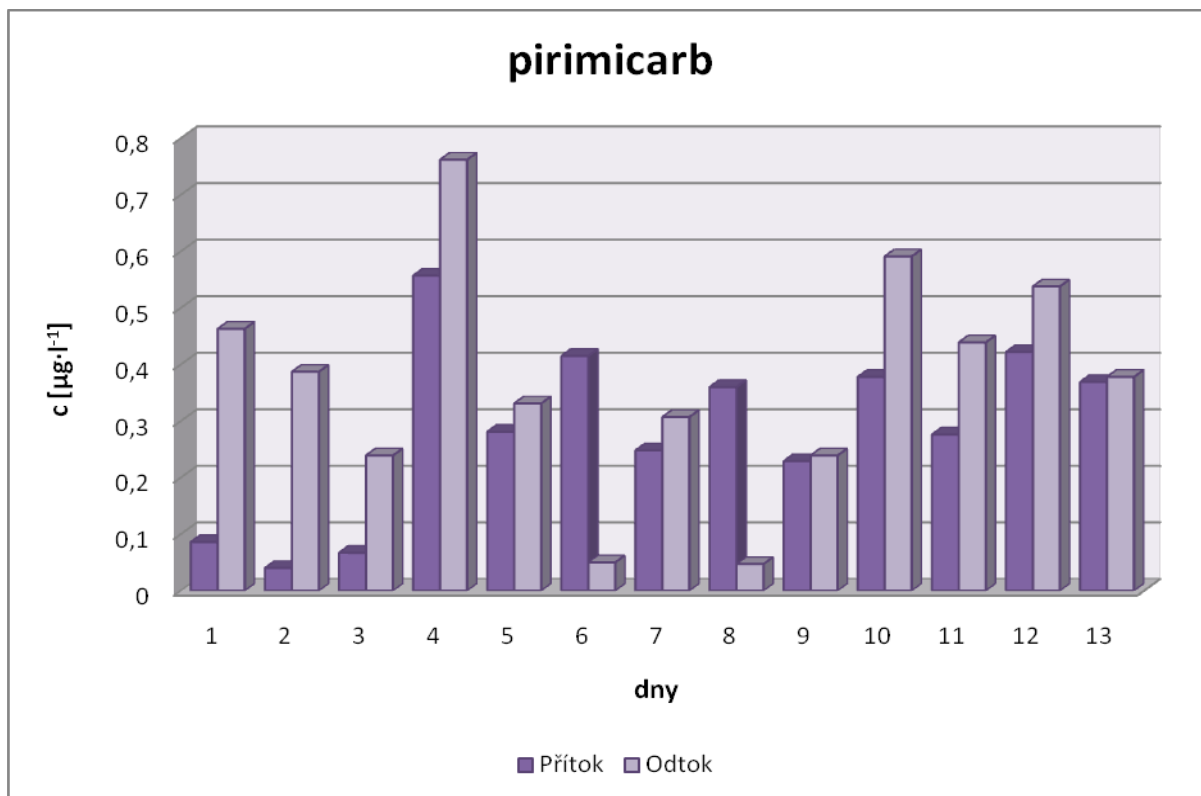
Graf č. 14: Změna koncentrace phosmetu na přítoku a na odtoku; stanovované pomocí GC/ECD

Tabulka č. 22: Průměrný úbytek jednotlivých pesticidů v průběhu čistících procesů během čtrnácti dní

analyty	prům. úbytek [%]
chlorpyrifos	70
dimethoate	60
diazinon	46
parathion	41
phosmet	35
carbofuran	17



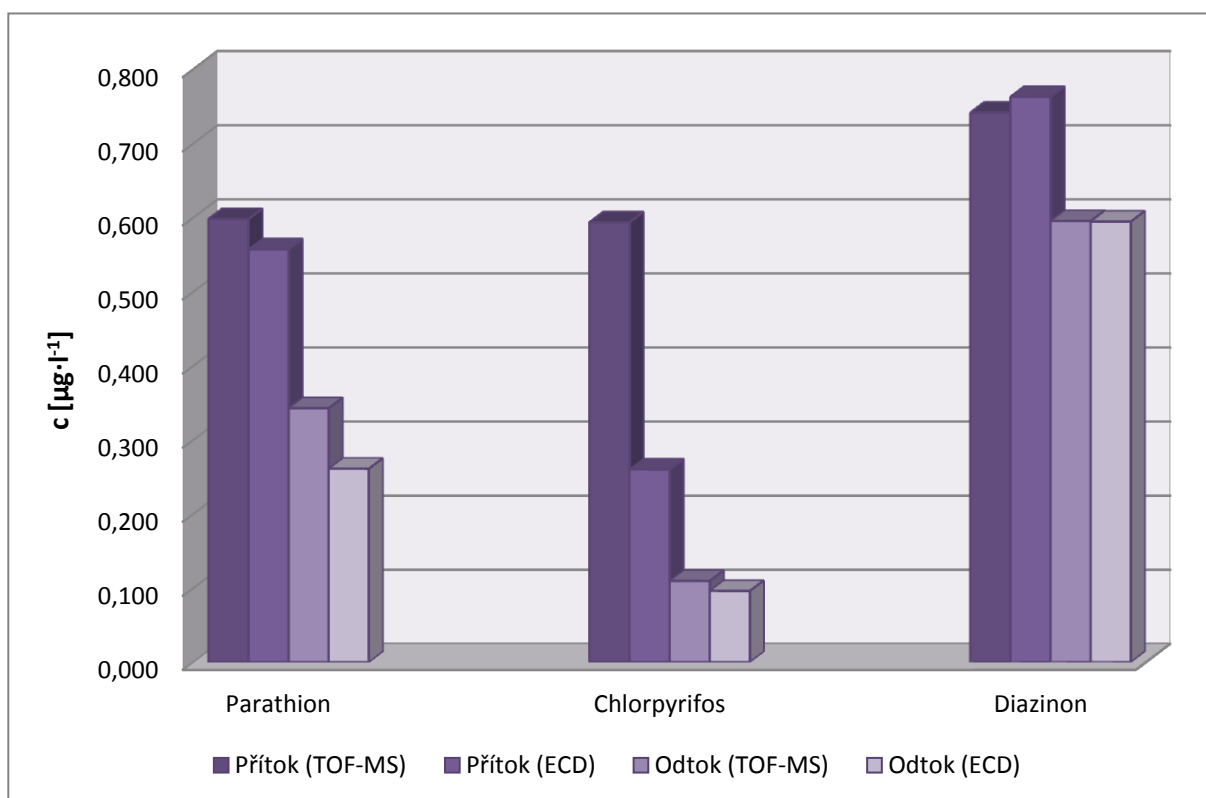
Graf č. 15: Změna koncentrace methiocarbu na přítoku a na odtoku; stanovované pomocí GC/MS-TOF



Graf č. 16: Změna koncentrace pirimicarbu na přítoku a na odtoku; stanovované pomocí GC/MS-TOF

Tabulka č. 23: Průměrné zvýšení koncentrace pesticidů v průběhu čisticích procesů během čtrnácti dní

analyty	prům. zvýšení [%]
methiocarb	22
pirimicarb	37



Graf č. 17: Porovnání průměrné koncentrace (za 14 dní) na přítoku a odtoku u organofosfátů stanovených pomocí GC/TOF-MS a GC/ECD

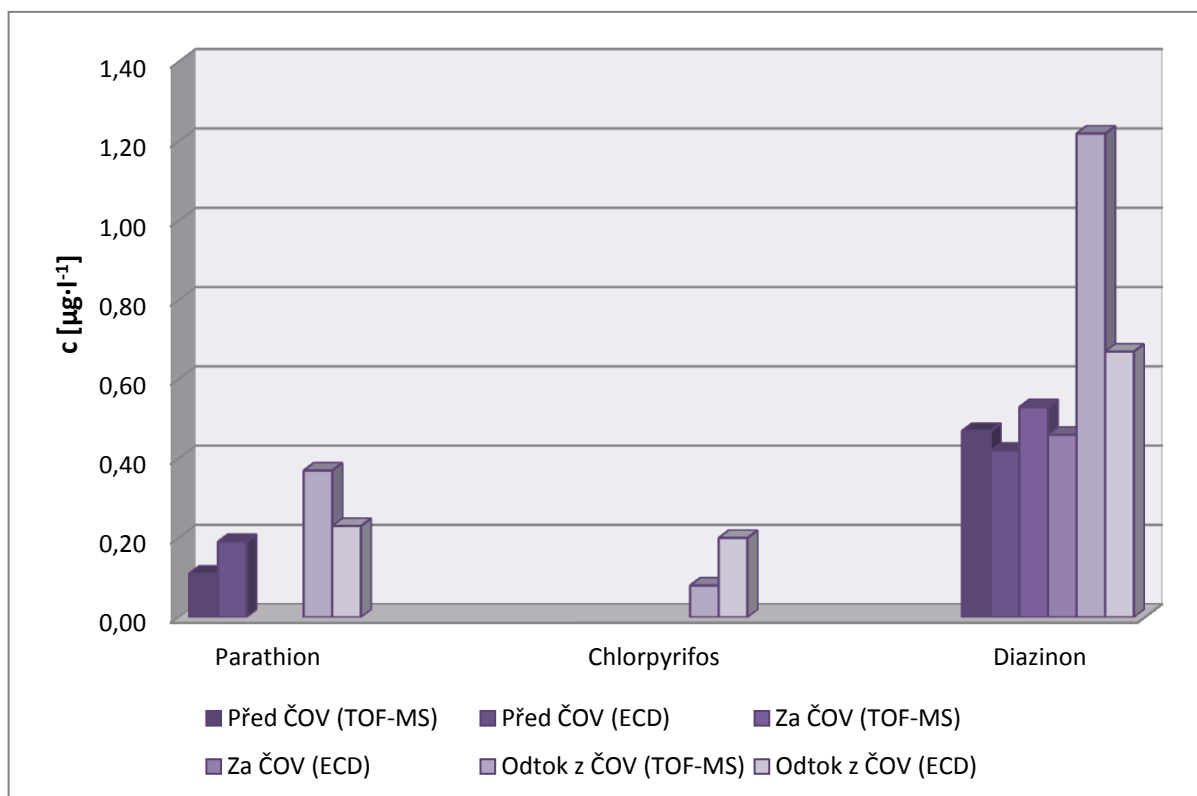
4.5 Výsledky stanovení pesticidů ve vzorcích povrchové vody

Vzorky povrchové vody byly odebírány z řeky Svratky – před ČOV, za ČOV a na odtoku z ČOV Brno-Modřice. Tyto odběry byly prováděny za účelem posouzení, zda voda vypouštěná z této ČOV kontaminuje povrchové vody. Výsledky analýzy jsou uvedeny v Tabulce č. 24.

U všech detekovaných sloučenin jsou zaznamenány vyšší koncentrace u vzorků odebíraných za ČOV než u vzorků odebíraných před ČOV. Přímě na odtoku jsou koncentrace sledovaných pesticidů nejvyšší. I když se jedná jen o velmi malé zvýšení koncentrací daných pesticidů, lze konstatovat, že v ČOV dochází k navýšení kontaminace povrchové vody; pravděpodobně se analyty uvolňují z kalů, kam se dříve nasorbovaly.

Tabulka č. 24: Výsledné koncentrace sledovaných pesticidů v povrchové vodě

pesticidy	GC/MS-TOF		
	c [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]		
	PŘED ČOV	ZA ČOV	ODTOK Z ČOV
aldicarb	nd	nd	nd
carbofuran	< LOQ	< LOQ	0,19±0,08
propamocarb	nd	nd	nd
methiocarb	0,93±0,04	1,26±0,12	3,49±0,28
dimethoate	nd	nd	nd
diazinon	0,47±0,05	0,53±0,07	1,22±0,06
phosmet	nd	nd	nd
pirimicarb	0,24±0,03	0,26±0,07	0,54±0,04
chlorpyrifos	nd	< LOQ	0,08±0,02
parathion	0,11±0,01	0,15±0,06	0,37±0,03
	GC/ECD		
	c [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]		
	PŘED ČOV	ZA ČOV	ODTOK Z ČOV
phosmet	nd	nd	nd
diazinon	0,42±0,08	0,46±0,03	0,67±0,05
dimethoate	nd	nd	nd
chlorpyrifos	0,12±0,07	0,15±0,08	0,20±0,06
parathion	0,19±0,03	nd	0,23±0,05

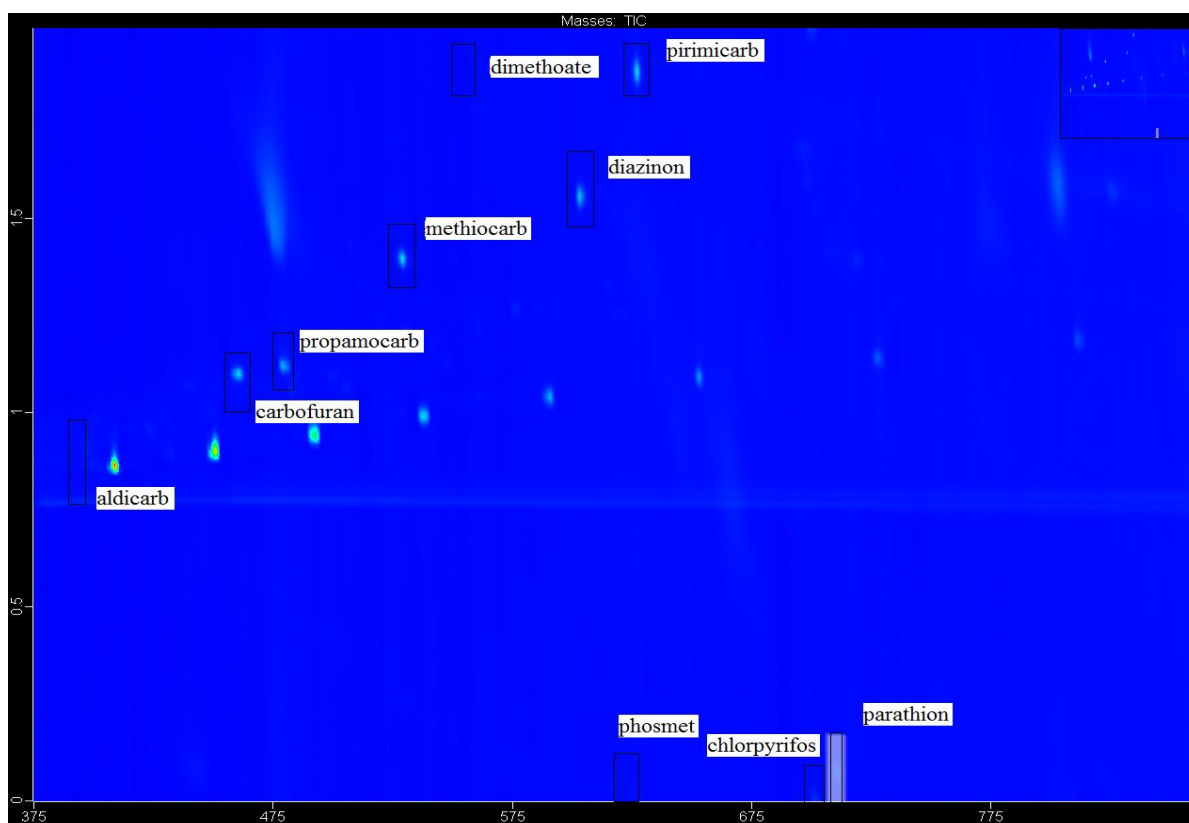


Graf č. 18: Porovnání koncentrace vzorků povrchové vody u organofosfátů stanovených pomocí GC/TOF-MS a GC/ECD

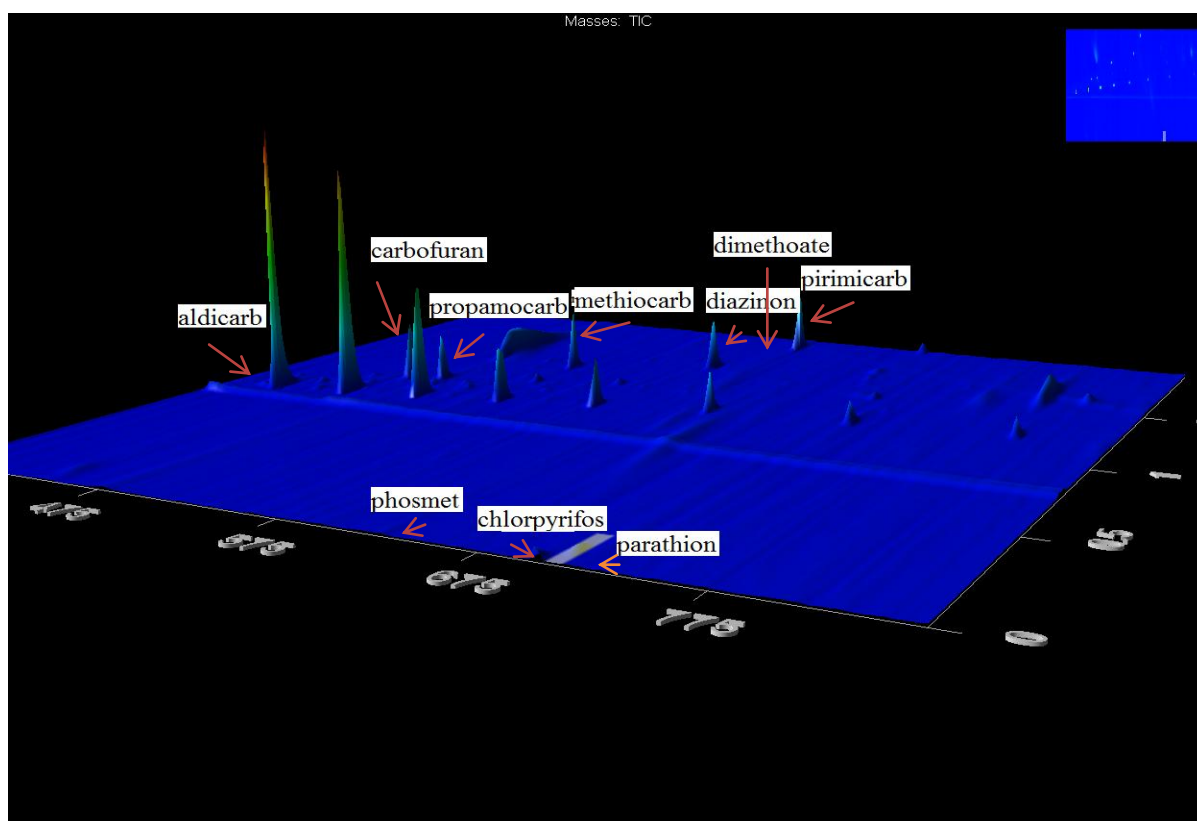
4.6 Analýza vybraných vzorků pomocí dvoudimenzionální chromatografie

Touto metodou byly analyzovány vzorky povrchové vody, které byly odebrány před ČOV a za ČOV a také směs standardů o koncentraci 500 ng·ml⁻¹.

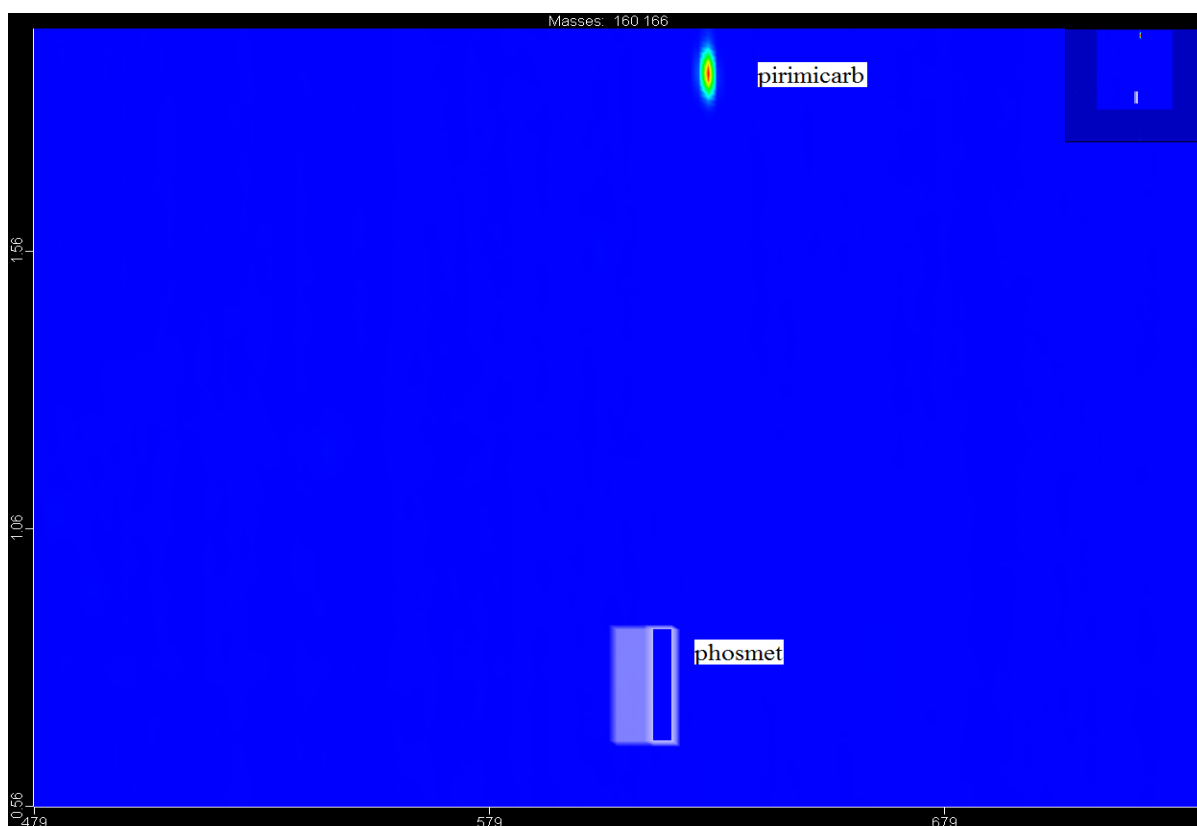
Ukázky těchto analýz jsou znázorněny v následujících 2D chromatogramech, kde na ose x je uveden retenční čas na primární koloně a na ose y retenční čas na sekundární koloně. Ve 2D chromatografii dochází k separaci látek dvěma odlišnými mechanismy, což zvyšuje účinnost separace a lepší identifikaci sloučenin, než tomu bylo v 1D. Příkladem mohou být sloučeniny pirimicarb a phosmet. Zatímco v 1D dochází k jejich vzájemné koeluci, ve 2D chromatografii jsou tyto látky rozděleny i ve směru osy y , a proto nedochází k vzájemnému překrývání píků (znázorněno na Obr. č. 20 a 21).



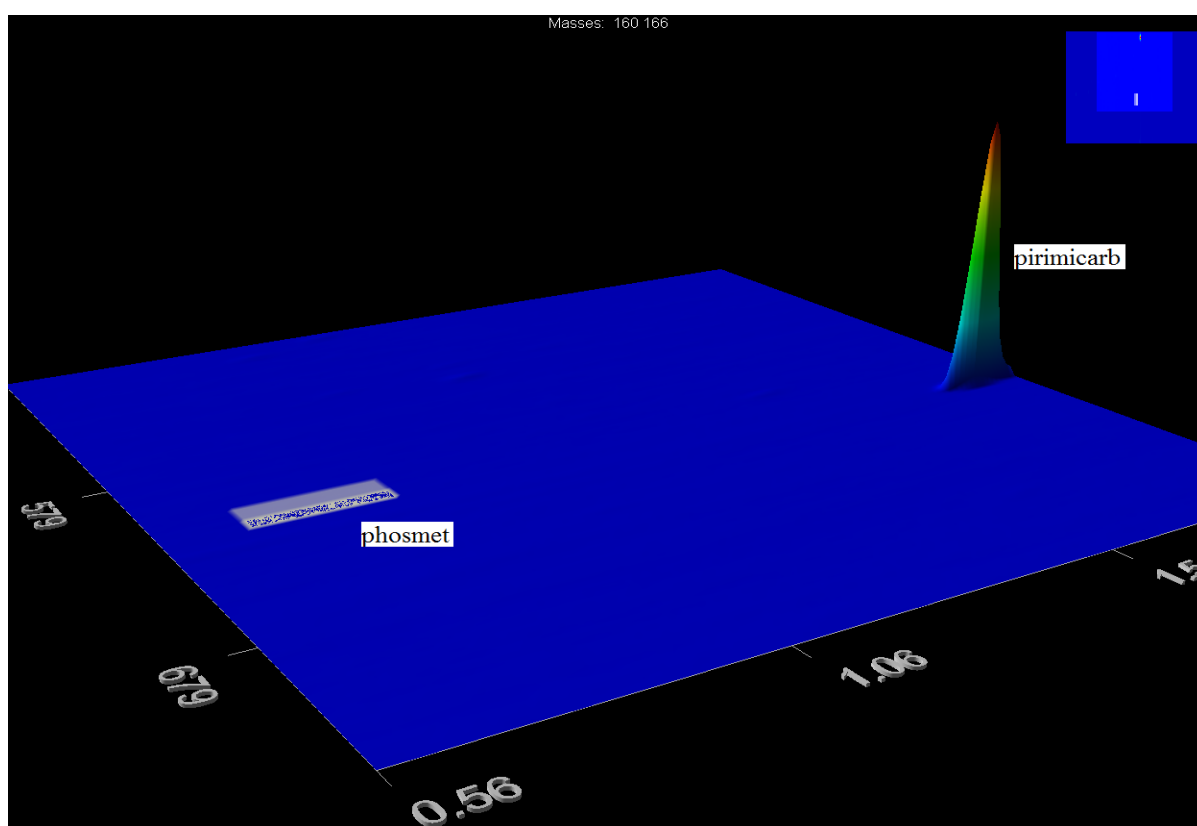
Obr. č. 18: Směs standardů o koncentraci $500 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$



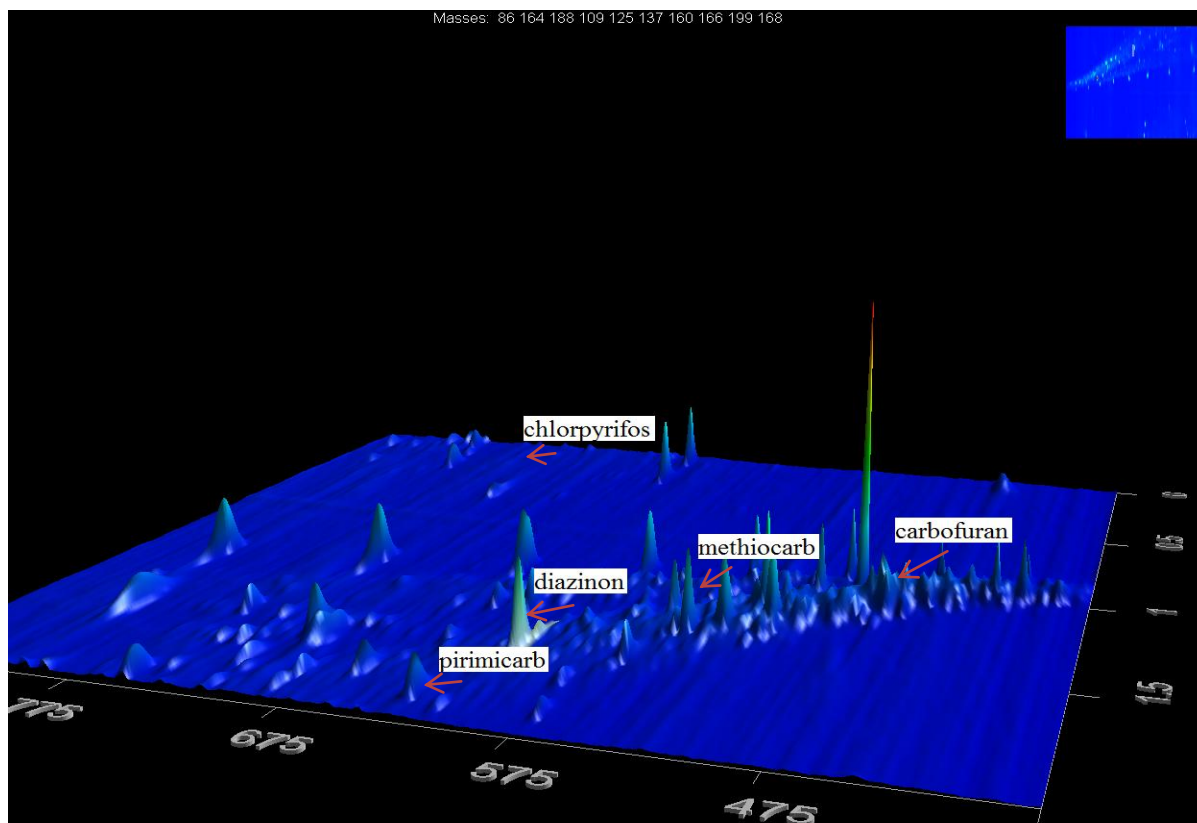
Obr. č. 19: Směs standardů o koncentraci $500 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$



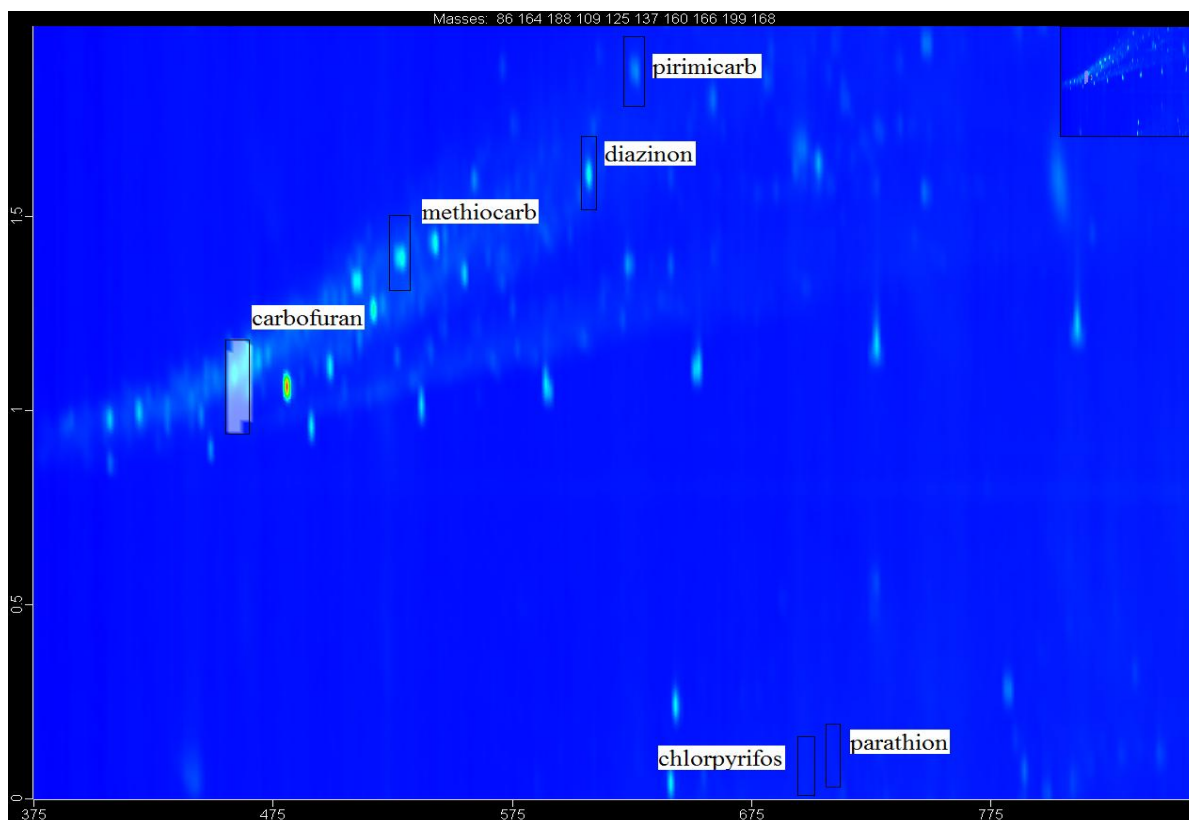
Obr. č. 20: Pirimicarb a phosmet, koncentrace $500 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$



Obr. č. 21: Pirimicarb a phosmet, koncentrace $500 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$



Obr. č. 24: Reálný vzorek povrchové vody, odebíráno za ČOV



Obr. č. 25: Reálný vzorek povrchové vody, odebíráno za ČOV

5. ZÁVĚR

Předložená diplomová práce byla zaměřena na stanovení vybraných pesticidů ve vodách pomocí plynové chromatografie. Na základě zpracované literární rešerše bylo vybráno deset pesticidů (5 ze skupiny organofosfátů a 5 ze skupiny karbamátů), které lze pomocí této metody stanovit. Jako detektor byl použit hmotnostní spektrometr s analyzátozem doby letu a detektor elektronového záchytu.

Cílem práce bylo optimalizovat vhodný postup pro stanovení vybraných pesticidů. Pro extrakci byla na základě provedené literární rešerše zvolena extrakce tuhou fází. Při optimalizaci postupu bylo ověřováno několik elučních činidel a dva typy kolonek (Oasis HLB a ENVI-18). Nejlepších výtěžností jednotlivých pesticidů bylo dosaženo, pokud byla použita eluční směs aceton-methanol v poměru 2:1 a Oasis HLB kolonky. Výtěžnost se pohybovala v rozmezí 65 – 105 %, pouze u propamocarbu dosahovala 42 %.

Vzorky odpadní vody byly odebírány na velkokapacitní čistírně odpadních vod v Brně-Modřicích po dobu 14 dní. Koncentrace sledovaných pesticidů se na přítoku i na odtoku pohybovaly řádově v desetinách (u methiocarbu v desítkách) $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. U sloučenin aldicarb, phosmet, propamocarb a dimethoate byly koncentrace často pod mezí detekce nebo kvantifikace. Během čistících procesů docházelo na ČOV k určité eliminaci těchto látek, z nichž nejvyšší účinnost odstranění byla prokázána u sloučeniny chlorpyrifos (průměrný úbytek koncentrace až 70 %). Naopak u sloučenin methiocarb a propamocarb byly na odtoku zaznamenány vyšší koncentrace než na přítoku (u methiocarbu o 22 %, u propamocarbu o 32 %). Tento přírůstek lze vysvětlit tím, že se uvolnily tyto pesticidy z kalů, kde byly dříve nasorbovány.

K ověření, zda se pesticidy dostávají z vyčištěných odpadních vod vypouštěných z ČOV do povrchových vod, byly odebírány vzorky povrchové vody na řece Svratce. Odběrová místa byla následující: před ČOV, za ČOV a přímo na odtoku z ČOV. U vzorků odebíraných za ČOV byly vesměs zjištěny vyšší koncentrace sledovaných pesticidů, než u vzorků odebíraných před ČOV. Přímo na odtoku byly koncentrace daných pesticidů nejvyšší. I když se jedná o malé množství (v desetinách nebo setinách $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) je zřejmé, že k určité kontaminaci povrchových vod pesticidními přípravky dochází. Důvodem může být sekundární kontaminace z kalů, kde mohou být sorbovány.

V závěru této práce je uvedena ukázka analýzy pesticidů pomocí dvoudimenzionální plynové chromatografie. Mezi výhody této metody patří větší kapacita píků, zvýšení poměru signál/šum a zisk strukturovaného 2D chromatogramu. To umožňuje snazší a přehlednější stanovení a identifikaci látek, než je tomu v 1D chromatografii.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Šuta, M.: Opatrně s pesticidy. *Ekolist* [online]. 2009, březen [cit. 25. 9. 2011]. Dostupné na www: <http://ekolist.cz/cz/publicistika/nazory-a-komentare/opatrne-s-pesticidy#disc>
- [2] Pesticidy jsou tikající bombou. *Inovace* [online]. 2009 [cit. 25. 9. 2011]. ISSN 1802-6206. Dostupné z www: <http://inovace.cz/novinky/318-pesticidy-jsou-tikajici-bombou>
- [3] SDĚLENÍ KOMISE RADĚ, EVROPSKÉMU PARLAMENTU, EVROPSKÉMU HOSPODÁŘSKÉMU A SOCIÁLNÍMU VÝBORU A VÝBORU REGIONŮ, *Tématická strategie udržitelného používání pesticidů* [online]. 2006, červenec [cit. 26. 9. 2011]. Dostupné na www: <http://eur-lex.europa.eu/>
- [4] *Pesticidy škodí zdraví, shodují se vědci.* [online]. 2008, prosinec [cit. 1. 10. 2011]. Dostupné na www: <http://www.mebio.cz/clanky/pesticidy-skodi-zdravi-shoduji-vedci/>
- [5] Oficiální stránky Ministerstva životního prostředí <http://www.mzp.cz/>
- [6] Oficiální stránky Ministerstva zemědělství <http://eagri.cz/public/web/mze/>
- [7] Kizlink, J.: *Technologie chemických látek*. 3. přeprac. vyd. Brno: VUT, 2005. 282 s. ISBN 80-214-2913-5.
- [8] Bukáčková, M.: *Multireziduální metody pro stanovení pesticidů ve vodách*. (Bakalářská práce. FCH VUT v Brně, Ústav chemie a technologie životního prostředí. Vedoucí bakalářské práce Prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.) Brno, 2010, 39 s.
- [9] Wright, D. A., Welbourn, P.: *Environmental toxicology*. Cambridge University: Press, 2002. 630 s. ISBN 0-521-58860-X.
- [10] Macháček, V., Panchartek, J., Pytela, O.: *Organická chemie, 2. část*. vyd. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2005. 300 s. ISBN 80-7194-763-6.
- [11] Aspelin, A. L.: *Background on history of pesticides use and regulation in the United States* [online]. 2003 [cit. 2. 10. 2011]. Dostupné na www: http://www.pestmanagement.info/pesticide_history/Two.pdf
- [12] Unsworth, J.: *History of pesticide use* [online]. 2010 [cit. 2. 10. 2012]. Dostupné na www: http://agrochemicals.iupac.org/index.php?option=com_sobi2&sobi2Task=sobi2Details&catid=3&sobi2Id=31
- [13] Pitter, P.: *Hydrochemie*. Praha: VŠCHT, 1999. 568s. ISBN 80-7080-340-1.
- [14] Hajšlová, J., Kocourek, V.: *Osud prostředků pro ochranu rostlin v potravním řetězci člověka*. [pdf dokument]. Vědecký výbor fytosanitární a životního prostředí. 2004 [cit. 5. 10. 2011]. 42 s. Dostupné na www: <http://www.phytosanitary.org/projekty/2003/vvf-05-03.pdf>

- [15] Popl, M., Fahnrich, J.: *Analytická chemie životního prostředí*. 4. přeprac. vyd. Praha: VŠCHT, 1999. 218 s. ISBN 80-7080-336-3.
- [16] Nikonorow, M. a kol.: *Pesticídy a toxicita prostředí*. vyd. Bratislava: Příroda, 1983.
- [17] Nollet, L.: *Handbook of water analysis*. 2. přeprac. vyd. CRC Press, 2007. 769 s. ISBN 0-8493-7033-7.
- [18] *Bezpečná práce s pesticidy* [online]. 1999 [cit. 6. 10. 2011]. Dostupné na [www: http://osha.europa.eu/fop/czech-republic/cs/topics/files/pesticides.pdf](http://osha.europa.eu/fop/czech-republic/cs/topics/files/pesticides.pdf)
- [19] Alterová, L.: *Pesticídy podle nových pravidel* [online]. 2008 [cit. 6. 10. 2011]. Dostupné na [www: http://www.agroweb.cz/Pesticidy-podle-novych-pravidel__s43x31644.html](http://www.agroweb.cz/Pesticidy-podle-novych-pravidel__s43x31644.html)
- [20] *Zákon č. 258/2000 Sb.* [online]. 2001 [cit. 8. 10. 2011]. Dostupné na [www: http://www.tzb-info.cz/pravni-predpisy/zakon-c-258-2000-sb-a-souvisejici-predpisy](http://www.tzb-info.cz/pravni-predpisy/zakon-c-258-2000-sb-a-souvisejici-predpisy)
- [21] *Zákon č. 356/2003 Sb.* [online]. 2008 [cit. 8. 10. 2011]. Dostupné na [www: http://www.mzp.cz/](http://www.mzp.cz/)
- [22] *Zákon č. 329/2004 Sb.* [online]. 2004 [cit. 8. 10. 2011]. Dostupné na [www: http://www.sagit.cz/pages/sbirkatxt.asp?zdroj=sb04329&cd=76&typ=r](http://www.sagit.cz/pages/sbirkatxt.asp?zdroj=sb04329&cd=76&typ=r)
- [23] *Vyhláška č. 221/2004 Sb.* [online]. 2004 [cit. 8. 10. 2011]. Dostupné na [www: http://www.sagit.cz/pages/sbirkatxt.asp?zdroj=sb04221&cd=76&typ=r](http://www.sagit.cz/pages/sbirkatxt.asp?zdroj=sb04221&cd=76&typ=r)
- [24] *Vyhláška č. 13/1994 Sb.* [online]. 2008 [cit. 8. 10. 2011]. Dostupné na [www: http://www.mzp.cz](http://www.mzp.cz)
- [25] Matthews, G. A.: *Pesticides: Health, Safety and the Environment*. USA: Blackwell Publishing Ltd, 2006. 248 s. ISBN 1-4051-3091-1.
- [26] Janů, H., Jeleček L.: Rachel Louise Carson. *Klaudyán* [online]. 2008 [cit. 2. 1. 2012], roč. 5/2008, č. 1, s. 53-56. Dostupné na [www: http://www.klaudyán.cz/dwnl/200801/02_janu_jelecek.pdf](http://www.klaudyán.cz/dwnl/200801/02_janu_jelecek.pdf)
- [27] *Paul H. Müller biography*. [online]. 2010, poslední úprava 17. 12. 2011 [cit. 2. 1. 2012]. Dostupné na [www: http://www.browsebiography.com/bio-paul_h_muller.html](http://www.browsebiography.com/bio-paul_h_muller.html)
- [28] *Rachel Carson*. [online]. 2012, [cit. 2. 1. 2012]. Dostupné na [www: http://www.nndb.com/people/843/000031750/](http://www.nndb.com/people/843/000031750/)
- [29] Vopršálová, M., Žáčková, P.: *Základy toxikologie pro farmaceuty*. vyd. Praha: Karolinum, 2000. 231s. ISBN 80- 7184-282-6.
- [30] Waxman, M. F.: *Agrochemical and pesticide safety handbook*. Florida: CRC Press LLC, 1998. 381 s. ISBN 1-56670-296-8.

- [31] Jursík, M., Soukup, J., Holec, J.: Mechanismus účinku herbicidů a projevy jejich působení na rostliny. *Listy cukrovarnické a řepařské* [online]. 2010, leden [cit. 10. 10. 2011], č. 1, s. 14-16. Dostupné na www: http://www.cukr-listy.cz/on_line/2010/PDF/14-16.PDF
- [32] Vlček, V., Pohanka, M.: Environmentální aspekty užití organofosforových a karbamátových pesticidů schválených k užití v České republice. *Chemické listy* [online]. 2011, květen [cit. 12. 10. 2012], s. 908-912. Dostupné na www: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_12_908-912.pdf
- [33] *PAN Pesticide Database* [databáze online]. Severní Amerika, 2000-2011 [cit. 12. 10. 2011]. Dostupné na www: <http://www.pesticideinfo.org/>
- [34] *EXTOXNET, Pesticides information profiles* [online]. 1996 [cit. 12. 10. 2011]. Dostupné na www: <http://extoxnet.orst.edu/pips/ghindex.html>
- [35] *EPA: United States Environmental Protection Agency* [online]. Poslední úprava 12. 8. 2011 [cit. 12. 10. 2011]. Dostupné na www: <http://www.epa.gov/gateway/science/pesticides.html>
- [36] Kirchner, M., Matisová, E.: Současné metody a nové trendy v izolaci reziduí pesticidů z beztukových potravin. *Chemické listy* [online]. 2003, říjen [cit. 20. 10. 2011], s. 396-405. Dostupné na www: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_07_04.pdf
- [37] Farid, E. A.: Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2001, vol. 20, no. 11, p. 649-661. ISSN 0165-9936.
- [38] Pareja, L., Fernández-Alba, A. R.: Analytical methods for pesticide residues in rice. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2011, vol. 30, no. 2, p. 270-291. ISSN 0165-9936.
- [39] Tse, H., Comba, M., Alaei, M.: Method for the determination of organophosphate insecticides in water, sediment and biota. *Chemosphere*, 2004, vol. 54, no. 1, p. 41-47. ISSN 0045-6535.
- [40] Filho, A. M., Santos, F. N., Pereira, A. P.: Development, validation and application of a method based on DI-SPME and GC-MS for determination of pesticides of different chemical groups in surface and groundwater samples. *Microchemical Journal*, 2010, vol. 96, no. 1, p. 139-145. ISSN 0026-265X.
- [41] Balinova, A., Mladenova, R., Shtereva, D.: Solid-phase extraction on sorbents of different retention mechanisms followed by determination by gas chromatography-mass spectrometric and gas chromatography-electron capture detection of pesticide residues in crops. *Journal of Chromatography A*, 2007, vol. 1150, no. 1-2, p. 136-144. ISSN 0021-9673.
- [42] Cochran, J.: Evaluation of comprehensive two-dimensional gas chromatography – time-of-flight mass spectrometry for the determination of pesticides in tobacco. *Journal of Chromatography A*, 2008, vol. 1186, no. 1-2, p. 202-210. ISSN 0021-9673.

[43] Liu, M., Hashi, Y., Song, Y., Lin J. M.: Simultaneous determination of carbamate and organophosphorus pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography-mass spektrometry. *Journal of Chromatography A*, 2005, vol. 1097, no. 1-2, p. 183-187. ISSN 0021-9673.

[44] González-Rodríguez, R. M., Rial-Otero, R., Cancho-Grande B., Simal-Gándara, J.: Determination of 23 pesticide residues in leafy vegetables using gas chromatography-ion trap mass spektrometry and analyte protectants. *Journal of Chromatography A*, 2008, vol. 1196-1197, p. 100-109. ISSN 0021-9673.

[45] Tsatsakis, A. M., Tzatzarakis, M. N., Tutudaki, M.: Pesticide levels in head hair samples of Cretan population as an indicator and past exposure. *Forensic Science International*, 2008, vol. 176, no. 1, p. 67-71. ISSN 0379-0738.

[46] Lozowicka, B., Jankowska, M., Kaczyński, P.: Pesticide residues in Brassica vegetables and exposure assessment of consumers. *Food control*, 2012, vol. 25, no. 2, p. 561-575. ISSN 0956-7135.

[47] Wu, G., Bao, X., Zhao, S., Wu, J., Han, A., Ye, Q.: Analysis of multi-pesticide residues in the foods of animal origin by GC-MS coupled with accelerated solvent extraction and gel permeation chromatography cleanup. *Food Chemistry*, 2011, vol. 126, no. 2, p. 646-654. ISSN 0308-8146.

[48] Chu, G., Hu, Z., Yao, H-Y.: Determination of 266 pesticide residues in apple juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass selective detection. *Journal of Chromatography A*, 2005, vol. 1063, no. 1-2, p. 201-210. ISSN 0021-9673.

[49] Eisner, A., Kurečková, K., Ventura, K.: Využití zrychlené extrakce rozpuštědlem pro izolaci aditiv z jednosložkových bezdýmých prachů. *Chemické listy* [online]. 2000, leden [cit. 1. 11. 2011], č. 94, s. 235-239. Dostupné na www: <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/archiv/2000-PDF/04-PDF/235-239.pdf>

[50] Mravcová, L.: *Praktikum z environmentální analýzy, zpracování vzorků půdy pro analýzu organických kontaminantů*. e-learning, FCH VUT Brno 2011.

[51] Čajka, T., Hajšlová, J., Lacina, O.: Inovativní přístupy v analýze reziduí pesticidů. In *XXXVI. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, sborník příspěvků. Skalský Dvůr, 23. - 25. května 2005*. Ed. Holasová, M., Fiedlerová, V., Špicner J. Praha: VÚPP, 2005. ISBN 80-86909-01-8.

[52] Čáslavský, J.: *Přednášky z předmětu Analytické metody technické praxe, postupy zpracování vzorků*. e-learning, FCH VUT Brno 2008.

[53] *Extrakce na tuhou fázi*. [online]. [cit. 20. 11. 2011]. Dostupné na www: <http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/13080/01.pdf>

- [54] Ahmed, F.: Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2001, vol. 20, no. 11, p. 649-661. ISSN 0165-9936.
- [55] Picó, Y., Fernández, M., Ruiz, M. J., Font, G.: Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2007, vol. 70, no. 2, p. 117-131. ISSN 0165-022X.
- [56] Y-Carbon. [online]. 2011 [cit. 3. 1. 2012]. Dostupné na www: <http://www.y-carbon.us/cleanpeakx/faq.asp?LinkRef=FAQ>
- [57] Štulík K. a kol.: *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. 264 s. ISBN 80-246-0852-9.
- [58] Riddellová, K.: *Izolační a separační metody, Extrakce (SPE disk)*. [online]. VŠCHT, [cit. 22. 11. 2011]. Dostupné na www: http://web.vscht.cz/poustkaj/ISM_SPE_DISK_Y_2011.pdf
- [59] LABICOM s. r. o, *Membránové a SPEC disk, Captiva*. [online]. [cit. 10. 1. 2012]. Dostupné na www: <http://www.labicom.cz/membranove-a-spec-disky--captiva-77/>
- [60] *Comparison of different sorbents for on-line solid-phase extraction of pesticides and phenolic compounds from natural water followed by liquid chromatography*. [online]. [cit. 25. 11. 2011]. Dostupné na www: <http://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/8986/Arxiu23.pdf?sequence=16>
- [61] Karliček, R. a kol.: *Analytická chemie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 2005. 281 s. ISBN 80-246-0348-9.
- [62] Worsfold, P., Townshend, A., Poole, C.: *Encyclopedia of Analytical Science*. Ten-Volume Set, 2nd ed. Elsevier, Oxford: Academic Press, 2005. 5 000 s. ISBN 978-0-12-369397-6.
- [63] Mravcová, L.: *Praktikum z instrumentální a strukturní analýzy*. FCH VUT Brno, 2011.
- [64] *Schéma plynového chromatografu*. [online]. Dostupné na www: http://users.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separb.htm
- [65] Chemsite, *Chromatography*. [online]. 2007 [cit. 11. 1. 2012]. Dostupné na www: <http://chemsite.lsrhs.net/Intro/chromatography.html>
- [66] Volka, K. a kol.: *Analytická chemie II*. Praha: VŠCHT, 1995. 236 s. ISBN 80-7080-227-8.
- [67] Reuter, N., Witte, E., Meer, I., Flipse L.: The Highly Selective Electron Capture Detector (ECD). *e-inspirations* [online]. 2010, leden [cit. 25. 10. 2011], vol. 26. Dostupné na www: <http://www.chem.agilent.com/enUS/Newsletters/einspirations/2010/february/pages/techtip.ax>
- [68] Čáslavský, J.: *Praktikum z instrumentální a strukturní analýzy, HPLC/MS*. e-learning, FCH VUT Brno, 2008.
- [69] Gómez, M. J., Gómez-Ramos, M. M., Agüera, A., Mezcua, M., Herrera, S., Fernández-Alba, A. R.: A new gas chromatography/mass spectrometry method for the simultaneous

analysis of target and non-target organic contaminants in waters. *Journal of Chromatography A*, 2009, vol. 1216, no. 18, p. 4071-4082. ISSN 0021-9673.

[70] LECO, *GC × GC Ortogonální dvourozměrná plynová chromatografie* [online]. 2007 [cit. 12. 3. 2012].

Dostupné na www: http://www.leco.cz/cz/products/sep_sci/gc_fid_ecd/gc_fid_ecd.htm

[71] Pizzutti, R. I., Vreuls, J. R., Kok, A., Roehrs, R., Martel, S., Friggi, A. C., Zanella, R.: Design of a compressed air modulator to be used in comprehensive multidimensional gas chromatography and its application in the determination of pesticide residues in grapes. *Journal of Chromatography A*, 2009, vol. 1216, no. 15, p. 3305-3311. ISSN 0021-9673.

[72] Lee, M. K., Weg, G., Traag, W. A., Mol, G. J.: Qualitative screening and quantitative determination of pesticides and contaminants in animal feed using comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2008, vol. 1186, no. 1-2, p. 325-339. ISSN 0021-9673.

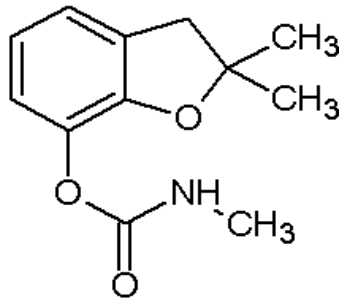
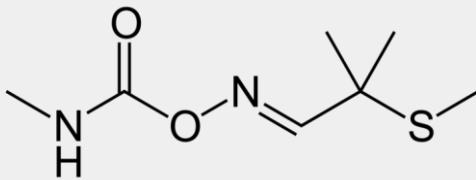
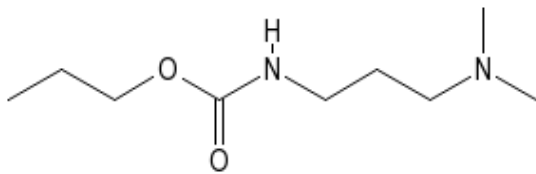
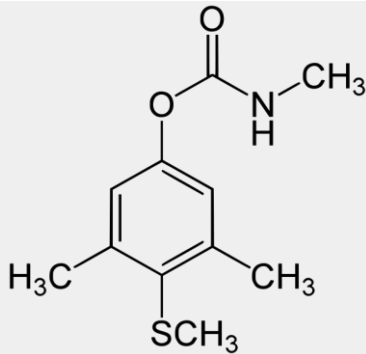
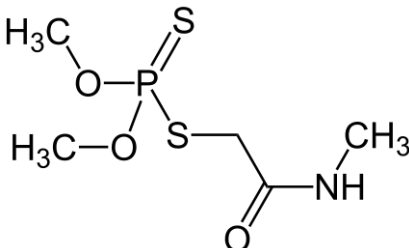
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

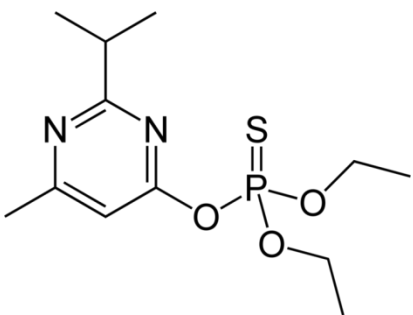
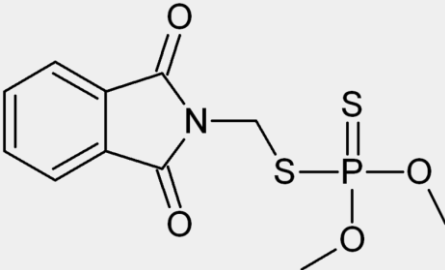
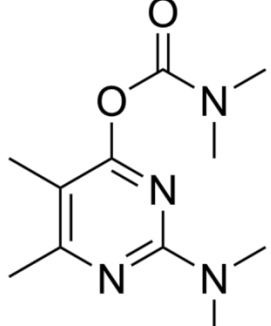
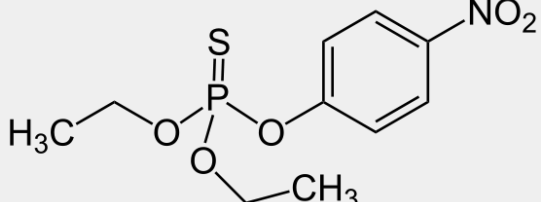
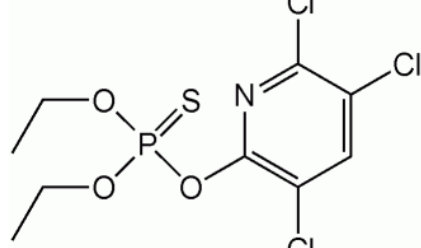
AC	aceton
ADI	přijatelná denní dávka pro člověka v mg
AChE	acetylcholinesteráza
AN	acetonitril
BCF	biokoncentrační faktor
BuChE	butyrylcholinesteraza
ČOV	čistírna odpadních vod
DCM	dichlormethan
DDT	dichlordifenyltrichlorethan
DG-SANCO	generální ředitelství pro zdraví a ochranu spotřebitele
ECD	detektor elektronového záchytu
EI	elektronová ionizace
EtAC	ethylacetát
EU	Evropská unie
FID	plamenový ionizační detektor
GAP	správná zemědělská praxe
GC	plynová chromatografie
GC/ECD	spojení plynové chromatografie s detektorem elektronového záchytu
GC × GC	dvoudimenzionální plynová chromatografie
GC/MS	spojení plynové chromatografie s hmotnostním detektorem
H	hexan
HCH	hexachlorcyklohexan
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
K _{oc}	půdní adsorpční koeficient
K _{ow}	rozdělovací koeficient oktanol-voda
LD	letální dávka
LLE	extrakce kapalnou fází
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MAE	mikrovlnná extrakce
Met	methanol
MLR	maximální reziduální limit
MS	hmotnostní spektrometr
MSPD	extrakce disperzní tuhou fází
NPD	termoionizační detektor
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PCB	polychlorované bifenyly
POP	perzistentní organické polutanty
PSE	vysokotlaká extrakce rozpouštědlem
RSD	relativní směrodatná odchylka
SBSE	přímá extrakce na tuhou fází v kapalném vzorku
SFE	superkritická fluidní extrakce
SOX	soxhlet extrakce

SPE	extrakce tuhou fází
SPME	mikroextrakce tuhou fází
USE	extrakce ultrazvukem
WHO	World Health Organisation

8. PŘÍLOHY

8.1 Strukturní vzorce sledovaných pesticidů

pesticidy	strukturní vzorce
carbofuran	
aldicarb	
propamocarb	
methiocarb	
dimethoate	

pesticidy	strukturní vzorec
diazinon	 <chem>CC1=CN(C(=N1)COP(=S)(OCC)OCC)C</chem>
phosmet	 <chem>COCOP(=S)SCN1C(=O)c2ccccc2C1=O</chem>
pirimicarb	 <chem>CN1C=NC2=C1C(=O)N(C)C2=C</chem>
parathion	 <chem>CCOP(=S)(OCC)Oc1ccc([N+](=O)[O-])cc1</chem>
chlorpyrifos	 <chem>CCOP(=S)Oc1cc(Cl)c(Cl)c(Cl)c1</chem>

8.2 Celkový pohled na čistírnu odpadních vod v Brně Modřicích



8.2.1 Kalové hospodářství



8.2.2 Aktivační nádrž (biologický stupeň čištění)



8.3 Ukázka extrakce tuhou fází

